



①⑨ BUNDESREPUBLIK  
DEUTSCHLAND



DEUTSCHES  
PATENTAMT

⑫ Übersetzung der  
europäischen Patentschrift

⑤① Int. Cl.<sup>6</sup>:  
A 61 K 9/50

⑧⑦ EP 0 333 523 B1

⑩ DE 689 26 828 T 2

②① Deutsches Aktenzeichen: 689 26 828.9  
⑧⑧ Europäisches Aktenzeichen: 89 302 746.6  
⑧⑧ Europäischer Anmeldetag: 20. 3. 89  
⑧⑦ Erstveröffentlichung durch das EPA: 20. 9. 89  
⑧⑦ Veröffentlichungstag  
der Patenterteilung beim EPA: 17. 7. 96  
④⑦ Veröffentlichungstag im Patentblatt: 9. 1. 97

DE 689 26 828 T 2

③① Unionspriorität: ③② ③③ ③①  
18.03.88 US 169973

⑦③ Patentinhaber:  
The UAB Research Foundation, Birmingham,  
Alabama, US; Southern Research Institute,  
Birmingham, Ala., US

⑦④ Vertreter:  
Blumbach, Kramer & Partner, 81245 München

⑧④ Benannte Vertragsstaaten:  
AT, BE, CH, DE, ES, FR, GB, GR, IT, LI, LU, NL, SE

⑦② Erfinder:  
Tice, Thomas T., Birmingham Alabama 35244, US;  
Eldridge, John H., Birmingham Alabama 35120, US;  
Gilley, Richard M., Birmingham, Alabama 35243, US;  
Stass, Jay K, Jefferson County Birmingham  
Alabama, US

⑤④ Verfahren zur Potenzierung einer Immunreaktion sowie die dazugehörigen Mittel

Anmerkung: Innerhalb von neun Monaten nach der Bekanntmachung des Hinweises auf die Erteilung des europäischen Patents kann jedermann beim Europäischen Patentamt gegen das erteilte europäische Patent Einspruch einlegen. Der Einspruch ist schriftlich einzureichen und zu begründen. Er gilt erst als eingelegt, wenn die Einspruchsgebühr entrichtet worden ist (Art. 99 (1) Europäisches Patentübereinkommen).

Die Übersetzung ist gemäß Artikel II § 3 Abs. 1 IntPatÜG 1991 vom Patentinhaber eingereicht worden. Sie wurde vom Deutschen Patentamt inhaltlich nicht geprüft.

DE 689 26 828 T 2

Die vorliegende Erfindung betrifft eine Formulierung zur oralen Verabreichung eines bioaktiven Mittels, das in einen oder mehrere biokompatible Polymer- oder Copolymer-Träger eingekapselt ist, vorzugsweise in ein biologisch abbaubares Polymer oder Copolymer. Das bioaktive Mittel ist in Form von Mikrokapseln eingekapselt, die aufgrund ihrer  
5 passenden Größe und physikalisch-chemischen Eigenschaften die Folliculi lymphatici aggregati, auch bekannt als Peyer-Plaques oder Peyer-Haufen, des Gastrointestinaltrakts in einem Tier ohne einen Verlust der Wirksamkeit aufgrund der Tatsache, daß das Mittel durch den Gastrointestinaltrakt hindurchgelaufen ist, erreichen und effektiv von diesen aufgenommen werden. Ähnliche Folliculi lymphatici aggregati können im Atemtrakt, im  
10 Urogenitaltrakt, im Dickdarm und in anderen, Schleimhäute umfassenden Geweben des Körpers gefunden werden. Nachfolgend werden die vorstehend beschriebenen Gewebe allgemein als mit Schleimhäuten verbundene lymphoide Gewebe bezeichnet.

Die Verwendung der Technik der Mikroverkapselung zum Schutz empfindlicher bioaktiver  
15 Mittel vor einem Abbau wurde wohlbekannt. Typischerweise wird ein bioaktives Mittel in einer Anzahl von Schutzwand-Materialien eingekapselt, die üblicherweise polymerer Natur sind. Das zu verkapselnde Mittel kann mit einer einzigen Wandung aus einem polymeren Material (Mikrokapseln) überzogen werden oder kann homogen in einer Polymermatrix dispergiert sein (Mikrosphären bzw. Mikrokügelchen). Nachfolgend  
20 bezieht sich der Begriff "Mikrokapseln" sowohl auf Mikrokapseln als auch auf Mikrokügelchen, und die Begriffe "Verkapselung" und "Mikroverkapselung" sollten dementsprechend verstanden werden. Die Menge an Mittel im Inneren der Mikrokapsel kann nach Wunsch variiert werden und schwankt von einer kleinen Menge bis zu einer hohen Menge von 95 % oder mehr der Mikrokapsel-Zubereitung.

25

Peyer-Plaques sind Aggregate lymphoider Knötchen, die in der Wand des Dünndarms, Dickdarms und Appendix angeordnet sind und ein wichtiger Teil der Verteidigung des Körpers gegen das Anhaften und Eindringen infektiöser Mittel und anderer Substanzen sind, die für den Körper fremd sind. Antigene sind Substanzen, die das Antikörper  
30 produzierende und/oder das durch Zellen vermittelte Immunsystem des Körpers induzieren und schließen solche Dinge wie Fremdprotein oder Fremdgewebe ein. Die immunologi-

sche Reaktion, die durch die Wechselwirkung eines Antigens mit dem Immunsystem induziert wird, kann positiv oder negativ im Hinblick auf die Fähigkeit des Körpers sein, eine Antikörper- oder zellvermittelte Immun-Antwort auf einen nachfolgenden erneuten Kontakt mit dem Antigen aufzubauen. Zellvermittelte Immun-Antworten schließen

5 Antworten wie beispielsweise das Abtöten fremder Zellen oder Gewebe, die "zellvermittelte Cytotoxizität" und Hypersensibilitäts-(Überempfindlichkeits-)Reaktionen des verzögerten Typs ein. Antikörper gehören zu einer Klasse von Proteinen, die Immunglobuline (Ig) genannt werden und als Reaktion auf ein Antigen produziert werden und die sich spezifisch mit dem Antigen verbinden. Wenn sich ein Antikörper und ein Antigen

10 miteinander verbinden, bilden sie einen Komplex. Dieser Komplex kann die Beseitigung des Antigens aus dem Körper unterstützen, das Abtöten lebender Antigene wie beispielsweise infektiöser Mittel und fremder Gewebe oder Krebsgewebe erleichtern und die Aktivität von Toxinen oder Enzymen neutralisieren. Im Fall von Schleimhaut-Flächen des Körpers besteht die Hauptklasse von Antikörpern, die in den Sekreten vorhanden sind, die

15 diese Stellen umspülen, aus Sekret-Immunglobulin A (sIgA). Sekret-IgA-Antikörper verhindern das Anhaften und Eindringen infektiöser Mittel und anderer Antigene an und durch die Schleimhaut-Gewebe des Körpers.

Zwar treten zahlreiche Antigene in den Körper über die Schleimhaut-Gewebe ein; ge-

20 wöhnlich angewendete Immunisierungs-Verfahren wie beispielsweise die intramuskuläre oder subkutane Injektion von Antigenen oder Vaccinen (Impfstoffen) induzieren jedoch selten das Auftreten von sIgA-Antikörpern in Schleimhaut-Sekreten. Das Auftreten von Sekret-IgA-Antikörpern wird am wirksamsten induziert durch direkte Immunisierung der mit den Schleimhäuten in Verbindung stehenden Lymphoid-Gewebe. Von diesen sind die

25 Peyer-Plaques des Gastrointestinaltrakts die größte Masse im Körper.

Peyer-Plaques besitzen als Vorstufen für IgA dienende B-Zellen, die die Lamina propria-Bereiche des Gastrointestinaltrakts und des oberen Atemtrakts besiedeln und zu reifen, IgA synthetisierenden Plasmazellen differenzieren. Es sind diese Plasmazellen, die

30 tatsächlich die Antikörper-Moleküle abscheiden. Untersuchungen von Heremans und Bazin, bei denen die Entwicklung der IgA-Reaktionen in Mäusen gemessen wurde, die

oral mit Antigen immunisiert wurden, zeigten, daß nacheinander Antigen-spezifische IgA-Plasmazellen auftraten, und zwar zuerst in den mesenterischen Lymphknoten, später in der Milz und am Ende in den Lamina propria des Gastrointestinaltrakts ("H. Bazin, G. Levi und G. Doria: Predominant contribution of IgA antibody-forming cells to an immune response detected in extraintestinal lymphoid tissues of germ free mice exposed to antigen via the oral route; in J. Immunol. 105 (1970), 1049" und "P.A. Crabbe, D.R. Nash, H. Bazin, H. Eyssen und J.F. Heremans: Antibodies of the IgA type in intestinal plasma cells of germ-free mice after oral or parenteral immunization with ferritin; in J. Exp. Med. 130 (1969), 723").

10

Spätere Untersuchungen haben gezeigt, daß eine orale Verabreichung von Antigenen zur Produktion von sIgA-Antikörpern im Darm und auch in Schleimhaut-Sekreten entfernt vom Darm führt, z.B. in Auswaschungen der Bronchien, im Stuhl, in der Milch, im Speichel und in Tränen ("J. Mestecky, J.R. McGhee, R.R. Arnold, S.M. Michalek, S.J. Prince und J.L. Babb; Selective induction of an immune response in human external secretions by ingestion of bacterial antigen; in: J. Clin. Invest. 61 (1978), 731"; "P.C. Montgomery, B.R. Rosner und J. Cohen; The secretory antibody response. Anti-DNP antibodies induced by dinitrophenylated Type III pneumococcus; in: Immunol. Commun. 3 (1974), 143"; und "L.A. Hanson, S. Ahistedt, B. Carlsson, B. Kaijser, P. Larsson, A. MattsbyBaltzer, A. Sohl Akerlund, C. Svanborg Eden und A.M. Dvennerholm; Secretory IgA antibodies to enterobacterial virulence antigens: their induction and possible relevance; in: Adv. Exp. Med. Biol. 1007 (1978), 165"). Es ist daher offensichtlich, daß Peyer-Plaques eine angereicherte Quelle für IgA-Vorstufen-Zellen sind, die nach Sensibilisierung durch ein Antigen einem zirkulären Wanderungsweg folgen und die Expression von IgA sowohl im Bereich des anfänglichen Kontakts mit einem Antigen als auch an Schleimhaut-Oberflächen erklären, die davon entfernt sind. Dieses zirkuläre Muster sorgt für ein Schleimhaut-Immunsystem durch kontinuierliches Transportieren sensibilisierter B-Zellen zu Schleimhäuten zur Antwort auf im Darm angetroffene Umwelt-Antigene und potentielle Pathogene.

30

Von besonderer Bedeutung für die vorliegenden Erfindung ist die Fähigkeit einer oralen Immunisierung unter Induzieren der Bildung schützender Antikörper. Es ist bekannt, daß die Aufnahme von Antigenen durch Tiere zum Auftreten Antigen-spezifischer sIgA-Antikörper in Bronchial- und Nasal-Auswaschungen führt. Beispielsweise zeigen Untersuchungen mit menschlichen Freiwilligen, daß eine orale Verabreichung von Influenza-Vaccine (-Impfstoff) wirksam dahingehend ist, die Bildung von sekretorischen Anti-Influenza-Antikörpern in Nasal-Sekreten zu induzieren.

Extensive Untersuchungen haben gezeigt, daß eine orale Immunisierung zum Induzieren des allgemeinen Schleimhaut-Immunsystems möglich ist. Jedoch haben mit seltenen Ausnahmen die großen Dosen, die dafür erforderlich sind, eine wirksame Immunisierung zu erzielen, diesen Weg als für die praktische Anwendung unbrauchbar gezeigt. Es ist klar, daß ein Verfahren oder eine Formulierung, die eine orale Verabreichung einer Komponente einschließen, derartig ausgestaltet sein muß, daß das Mittel während seiner Passage durch den Gastrointestinaltrakt vor einem Abbau geschützt wird und die Abgabe der Komponente an die Peyer-Plaques erzielt wird. Wenn dies nicht möglich ist, erreicht die Komponente die Peyer-Plaques - wenn überhaupt - nur in unzureichender Menge oder in unwirksamem Zustand.

Daher existiert ein Bedarf für ein Verfahren zur oralen Immunisierung, das in wirksamer Weise das Immunsystem stimuliert und das Problem eines Abbaus des Antigens während seiner Passage durch den Gastrointestinaltrakt bis zu den Peyer-Plaques überwindet. Noch genauer gesagt besteht ein Bedarf für ein Verfahren der zielgerichteten Abgabe eines Antigens an die Peyer-Plaques und die Freisetzung des Antigens, sobald es im Körper ist. Es besteht auch ein Bedarf für ein Verfahren zur Immunisierung über andere Schleimhaut-Gewebe des Körpers, das die Probleme eines Abbaus des Antigens überwindet und die Abgabe des Mittels auf die mit den Schleimhäuten verbundenen Lymphoid-Gewebe richtet. Außerdem besteht ein Bedarf zum Schutz von auf die Schleimhäute applizierten bioaktiven Mitteln vor einem Abbau, bei dem der Eintritt der Mittel in den Körper durch die mit den Schleimhäuten verbundenen Lymphoid-Gewebe verbessert oder zielgerichtet

ermöglicht wird und das bioaktive Mittel freigesetzt wird, sobald es in den Körper eingetreten ist.

5 So bezieht sich die vorliegende Erfindung unter anderem auf eine Formulierung zur zielgerichteten Abgabe eines bioaktiven Mittels an den Körper eines Tiers durch Aufbringung auf die Schleimhaut und anschließende Freisetzung des Mittels im Körper, insbesondere durch orale und intratracheale Verabreichung. Das Mittel ist mikrokapselt in einem biokompatiblen Polymer oder Copolymer, vorzugsweise in einem biologisch abbaubaren Polymer oder Copolymer, das in der Lage ist, den Gastrointestinaltrakt zu  
10 durchlaufen oder in einer Schleimhaut-Oberfläche ohne Abbau oder unter nur minimalem Abbau zu existieren, so daß das Mittel die Peyer-Plaques oder andere mit der Schleimhaut verbundene Lymphoid-Gewebe unverändert und in wirksamen Mengen erreicht und in diese eintritt.

15 Der Begriff "biokompatibel" ist definiert im Zusammenhang mit einem Polymermaterial, das für den Körper nicht toxisch ist, das nicht cancerogen ist und das in Körpergeweben keine Entzündung induzieren sollte. Es ist bevorzugt, daß der Polymerträger der Mikrokapsel biologisch abbaubar in dem Sinne ist, daß er durch Prozesse im Körper zu Produkten abgebaut werden sollte, die durch den Körper einfach entsorgbar sind und sich nicht  
20 im Körper akkumulieren sollten. Die Mikrokapseln sind auch von einer Größe und physikalisch-chemischen Zusammensetzung, die wirksam und selektiv von den Peyer-Plaques aufgenommen werden kann. Dadurch werden die Probleme, daß das Mittel die Peyer-Plaques oder andere, mit Schleimhäuten in Verbindung stehende Gewebe erreichen und von diesen aufgenommen werden soll, gelöst.

25

In einem Aspekt stellt die Erfindung eine Zubereitung zur Abgabe eines bioaktiven Mittels an ein mit Schleimhäuten verbundenes lymphoretikulares Gewebe eines Menschen oder anderen Tieres bereit, die umfaßt:

- 30 - biokompatible bzw. bioverträgliche Mikrokapseln, die ein bioaktives Mittel umfassen, das in einem biokompatiblen Träger eingekapselt ist, und eine Größe von

- 1  $\mu\text{m}$  bis weniger als 5  $\mu\text{m}$  aufweist, zur selektiven Absorption und zum Durchtritt durch ein mit einer Schleimhaut in Verbindung stehendes lymphoretikulares Gewebe, um für systemische Immunität zu sorgen; und
- 5 - biokompatible bzw. bioverträgliche Mikrokapseln, die das bioaktive Mittel in in einem biokompatiblen Träger eingekapselter Form umfassen, und eine Größe zwischen 5  $\mu\text{m}$  und 10  $\mu\text{m}$  aufweisen, zur selektiven Absorption und Retention durch ein mit einer Schleimhaut in Verbindung stehendes lymphoretikulares Gewebe, um für Schleimhaut-Immunität zu sorgen;
- 10 als kombiniertes Präparat zur Potenzierung der Immun-Antwort eines Menschen oder eines anderen Tieres.

In einem zweiten Aspekt wird bereitgestellt die Verwendung (1) biokompatibler Mikrokapseln, die ein bioaktives Mittel umfassen, das in einem biokompatiblen Träger eingekapselt ist, und eine Größe im Bereich von 1  $\mu\text{m}$  bis weniger als 5  $\mu\text{m}$  aufweisen, um für systemische Immunität zu sorgen; und (2) biokompatibler Mikrokapseln, die ein bioaktives Mittel umfassen, das in einen biokompatiblen Träger eingekapselt ist, und eine Größe zwischen 5  $\mu\text{m}$  und 10  $\mu\text{m}$  aufweisen, um für Schleimhaut-Immunität zu sorgen, bei der Herstellung einer Zubereitung, die selektiv durch das mit der Schleimhaut verbundene lymphoretikulare Gewebe absorbiert werden kann, um für einen Menschen oder ein anderes Tier sowohl systemische als auch Schleimhaut-Immunität zu erreichen.

Die Erfindung schließt auch ein Verfahren zur Herstellung einer Zubereitung ein, um bei einem Menschen oder einem anderen Tier sowohl für systemische als auch für Schleimhaut-Immunität zu sorgen, wobei das Verfahren die Schritte umfaßt, daß man für eine derartige Verwendung (1) biokompatible Mikrokapseln, die ein bioaktives Mittel umfassen, das in einem biokompatiblen Träger eingekapselt ist, und die eine Größe im Bereich von 1  $\mu\text{m}$  bis weniger als 5  $\mu\text{m}$  aufweisen, um für systemische Immunität zu sorgen, und (2) biokompatible Mikrokapseln, die ein bioaktives Mittel umfassen, das in einem biokompatiblen Träger eingekapselt ist, und die eine Größe zwischen 5  $\mu\text{m}$  und 10  $\mu\text{m}$  aufweisen, um für Schleimhaut-Immunität zu sorgen, formuliert.

Ein vierter Aspekt der Erfindung besteht in einer Zubereitung, die angepaßt ist ausschließlich zur Verabreichung auf einem Weg, der von einer oralen Verabreichung verschieden ist, an den Gastrointestinaltrakt und zur selektiven Abgabe eines bioaktiven Mittels an ein mit der Schleimhaut verbundenes lymphoretikulares Gewebe eines Menschen oder eines anderen Tieres, wobei die Zubereitung umfaßt

- (1) biokompatible Mikrokapseln, die ein bioaktives Mittel umfassen, das in einem biokompatiblen Träger eingekapselt ist, und die eine Größe von 1  $\mu\text{m}$  bis weniger als 5  $\mu\text{m}$  aufweisen, um systemische Immunität zu schaffen; und
- 10 (2) biokompatible Mikrokapseln, die ein bioaktives Mittel umfassen, das in einem biokompatiblen Träger eingekapselt ist, und die eine Größe zwischen 5  $\mu\text{m}$  und 10  $\mu\text{m}$  aufweisen, um Schleimhaut-Immunität zu schaffen;

mit der Maßgabe, daß entweder (i) die Zubereitung angepaßt ist ausschließlich für eine orale Inhalation, eine nasale Verabreichung, rektale Verabreichung oder ophthalmische Verabreichung, oder (ii) der Träger kein Proteinoid ist.

In noch weiteren Aspekten wird bereitgestellt die Verwendung biokompatibler Mikrokapseln, die umfassen

20

- (i) ein bioaktives Mittel, das in einem biokompatiblen Träger eingekapselt ist, und die eine Größe im Bereich von 1  $\mu\text{m}$  bis weniger als 5  $\mu\text{m}$  aufweisen, zur Absorption durch und zum Durchgang durch ein mit der Schleimhaut verbundenes lymphoretikulares Gewebe; oder
- 25 (ii) ein bioaktives Mittel, das in einem biokompatiblen Träger eingekapselt ist, und die eine Größe zwischen 5  $\mu\text{m}$  und 10  $\mu\text{m}$  aufweisen, zur Absorption und Retention durch ein mit der Schleimhaut verbundenes lymphoretikulares Gewebe,

bei der Herstellung einer Zubereitung zur Schaffung von systemischer Immunität.

30



Eingeschlossen in die Erfindung ist eine Zubereitung zur Potenzierung der Immun-Antwort eines Menschen oder eines anderen Tieres, die Mikrokapseln umfaßt, die eine Größe zwischen 1  $\mu\text{m}$  und 10  $\mu\text{m}$  aufweisen und die ein bioaktives Mittel enthalten, das in einem biokompatiblen Träger eingekapselt ist, wobei die Zubereitung angepaßt ist ausschließlich zur parenteralen Verabreichung, mit der Maßgabe, daß der Träger kein Proteinoid oder keine Polyacryl-Stärke ist.

Ein weiterer Aspekt der Erfindung ist ein Verfahren zur Herstellung einer pharmazeutischen Zubereitung, das die Schritte umfaßt, daß man

10

- ein bioaktives Mittel in einem biokompatiblen Träger unter Bildung erster Mikrokapseln mit einer Größe von 1  $\mu\text{m}$  bis weniger als 5  $\mu\text{m}$  und zweiter Mikrokapseln mit einer Größe zwischen 5  $\mu\text{m}$  und 10  $\mu\text{m}$  einkapselt; und
- die ersten und zweiten Mikrokapseln zu einer pharmazeutischen Zubereitung formuliert, die angepaßt ist ausschließlich für die Verabreichung über einen Weg, der verschieden ist von einer oralen Verabreichung, an den Gastrointestinaltrakt, mit der Maßgabe, daß entweder
  - (i) die Zubereitung angepaßt ist ausschließlich für eine orale Inhalation, eine nasale Verabreichung, rektale Verabreichung oder ophthalmische Verabreichung, oder
  - (ii) der Träger kein Proteinoid ist.

20

Die Erfindung stellt zusätzlich ein Verfahren zur Herstellung einer pharmazeutischen Zubereitung bereit, das die Schritte umfaßt, daß man

- ein bioaktives Mittel in einem biokompatiblen Träger unter Bildung von Mikrokapseln mit einer Größe zwischen 1  $\mu\text{m}$  und 10  $\mu\text{m}$  einkapselt; und
- die Kapseln zu einer Zubereitung formuliert, die angepaßt ist ausschließlich zur parenteralen Verabreichung, mit der Maßgabe, daß der Träger kein Proteinoid oder keine Polyacryl-Stärke ist.

30

Andere Aspekte der Erfindung sind eine Zubereitung zur Potenzierung der Immun-Antwort eines Menschen oder eines anderen Tieres, welche eine Mischung eines ersten freien bioaktiven Mittels zur Schaffung einer primären Antwort und biokompatible Mikrokapseln einer Größe zwischen 1  $\mu\text{m}$  und 10  $\mu\text{m}$  umfaßt und ein zweites bioaktives Mittel enthält, das in einem biokompatiblen Träger eingekapselt ist, zur pulsartigen Freigabe unter Schaffung einer Folge-Antwort, und ein Verfahren zur Herstellung einer pharmazeutischen Zubereitung, welches die Schritte umfaßt, daß man

- ein bioaktives Mittel, das gewählt ist aus Antigenen, Allergenen, Lymphokinen, Monokinen und Immuno-Modulator-Mitteln, in einem biokompatiblen Träger unter Bildung von Mikrokapseln mit einer Größe zwischen 1  $\mu\text{m}$  und 10  $\mu\text{m}$  einkapselt; und
- das bioaktive Mittel in freier Form und die Mikrokapseln zu einer Zubereitung formuliert.

Bevorzugte Ausführungsformen der Erfindung tauchen in den abhängigen Ansprüchen und in der folgenden Beschreibung auf.

### Kurze Beschreibung der Figur

Figur 1 zeigt die Plasma-IgA-Antworten in Mäusen, bestimmt durch Endpunkt-Titration.

### Detaillierte Beschreibung der Erfindung

Es folgen nun Veranschaulichungen der Verfahrensweisen, die Ausführungsformen der Erfindung darstellen. Diese Veranschaulichungen zeigen die das mit der Schleimhaut verbundene lymphoide Gewebe ansteuernde und programmierte Abgabe von Antigenen [Trinitrophenyl-Schlüsselloch-Napfschnecken-Hämocyanin (Trinitrophenyl-Keyhole Limpet Hemocyanin; TNP-KLH) und Toxoid-Impfstoff von Staphylococcen-Enterotoxin B] und eines Arzneimittels (Etretnat), eingekapselt in ein Copolymer aus DL-Lactid und Glycolid [Poly-(DL-lactid-co-glycolid)] an Mäuse.

Es sollte jedoch angemerkt werden, daß außer Poly-(DL-lactid-co-glycolid) auch andere Polymere verwendet werden können. Beispiele solcher Polymere schließe Poly-(glycolid), Poly-(DL-lactid-co-glycolid), Copolyoxalate, Polycaprolacton, Poly-(lactid-co-caprolacton), Poly-(esteramide), Polyorthoester und Polyhydroxybuttersäure sowie Polyanhydride  
5 ein, sind jedoch nicht auf diese beschränkt.

Es können auch andere bioaktive Komponenten verwendet werden. Beispiele solcher anderer bioaktiver Komponenten schließen ein, ohne auf diese beschränkt zu sein: Antigene zur Impfung gegen durch Viren, Bakterien, Protozoen oder Pilze verursachte Krankheiten wie beispielsweise Impfstoffe gegen Influenzaviren, Atemwegs-Syncyten-Viren,  
10 Parainfluenzaviren, gegen Hemophilus-Influenza, gegen Bordetella pertussis, gegen Neisseria gonorrhoeae, gegen Streptococcus pneumoniae und gegen Plasmodium falciparum, oder Impfstoffe gegen andere Krankheiten, die durch pathogene Mikroorganismen verursacht werden, oder Antigene zur Impfung gegen Krankheiten, die durch Makroorga-  
15 nismen wie beispielsweise Helminthen-Pathogene verursacht werden, oder Antigene zur Impfung gegen Allergien. Weitere bioaktive Mittel, die verwendet werden können, schließen Immuno-Modulatoren, Nährstoffe, Arzneimittel, Peptide, Lymphokine und Cytokine ein, sind jedoch nicht auf diese beschränkt.

20

## **I. Mikroverkapselung**

### **A. Herstellung von mit Farbstoff beladenen Mikrokapseln**

Cumarin, ein in Wasser unlöslicher Fluoreszenz-Farbstoff, wurde mit Polystyrol mikro-  
25 verkapselt, das ein nicht biologisch abbaubares Polymer ist, um fluoreszierende Mikrokapseln zu liefern, die dazu verwendet werden können, das Eindringen von Mikrokapseln in die Peyer-Plaques zu verfolgen. Die Verfahrensweise, die zur Herstellung dieser Mikrokapseln angewendet wurde, war die folgende:

30 Zuerst wurde eine Polymer-Lösung hergestellt, indem man 4,95 g Polystyrol (Typ 685D; Dow Chemical Company, Midland, MI) in 29,5 g Methylenchlorid löste (Reagens-

Qualitätsstufe; Eastman Kodak, Rochester, NY). Als nächstes wurden 0,05 g Cumarin (Polysciences, Inc., Warrington, PA) der Polymer-Lösung zugesetzt, und man ließ die Substanz sich lösen, indem man die Mischung mit einem Magnetührstab rührte.

- 5 In einem getrennten Gefäß wurde eine 10 Gew.-%ige wäßrige Polyvinylalkohol-Lösung (PVA-Lösung) als Behandlungslösung hergestellt, indem man 40 g PVA (Vinol 2050; Air Products and Chemicals, Allentown, PA) in 360 g entionisierten Wassers löste. Nach Herstellung der PVA-Lösung wurde die Lösung gesättigt, indem man 6 g Methylenchlorid zusetzte. Als nächstes wurde die PVA-Lösung in einen 1 l-Harzessel (Ace Glass, Inc.,  
10 Vineland, NJ) gegeben, der mit einer mit einer zentrierten Seele versehenen Rührwelle und einem 2,5 in Teflon-Flügelrührer ausgerüstet war, und die Lösung wurde bei etwa 380 Upm mittels eines Fisher-Motors des Typs "stedi speed" gerührt.

- Die Polystyrol-Cumarin-Mischung wurde dann dem Harzessel zugegeben, der das PVA-Bearbeitungsmedium enthält. Dies wurde in der Weise bewirkt, daß man die Polystyrol-Cumarin-Mischung durch einen mit einem langen Stiel und einer Bohrung mit einer Weite von 7 mm versehenen Trichter goß, der die Mischung in den Harzessel leitete. Hierbei ergab sich eine stabile Öl-in-Wasser-Emulsion, die anschließend etwa 30 min lang bei Umgebungsdruck gerührt wurde, um Öl-Mikrotröpfchen der geeigneten Größe zu erhalten. Der Harzessel wurde geschlossen, und der Druck in dem Harzessel wurde schrittweise auf einen Wert von 520 mm Hg mittels einer Wasserstrahlpumpe erniedrigt, die mit einem Manometer und einem Entlüftungsventil verbunden war. Der Inhalt des Harzessels wurde bei verringertem Druck etwa 24 h lang gerührt, wodurch ermöglicht wurde, daß das gesamte Methylenchlorid verdampfte. Nachdem das gesamte Methylenchlorid verdampft war, wurden die gehärteten Mikrokapseln durch Zentrifugieren gewonnen und  
20 72 h lang in einer bei Raumtemperatur gehaltenen Vakuumkammer getrocknet.

### **B. Herstellung von mit Antigen beladenen Mikrokapseln**

- 30 TNP-KLH, ein in Wasser lösliches Antigen, wurde in Poly-(DL-lactid-co-glycolid) (einem Copolymer aus DL-Lactid und Glycolid), einem biokompatiblen, unter biologischen

Bedingungen abbaubaren Polyester eingekapselt. Die Verfahrensweise, die zur Herstellung der Mikrokapseln angewendet wurde, war die folgende:

5 Zuerst wurde eine Polymer-Lösung hergestellt, indem man 0,5 g eines 50:50-Copolymers aus DL-Lactid und Glycolid (50:50 Poly-(DL-lactid-co-glycolid)) in 4,0 g Methylenchlorid löste. Als nächstes wurden 300  $\mu$ l einer wäßrigen Lösung von TNP-KLH (46 mg TNP-KLH/ml; nach Dialyse) der Poly-(DL-lactid-co-glycolid)-Lösung zugesetzt und in dieser dispergiert, indem man die Mischung mit einem Vortex-Genie 2-Rührer (Scientific Industries, Inc., Bohemia, NY) verwirbelte.

10

In einem getrennten Gefäß wurde eine 8 Gew.-%ige wäßrige PVA-Lösung hergestellt, indem man 4,8 g PVA in 55,2 g entionisierten Wassers löste. Nach Lösen des PVA wurde die PVA-Lösung einem 100 ml-Harzessel (Kontes Glass, Inc., Vineland, NJ) zugeleitet, der mit einer mit einer zentrierten Seele versehenen Rührwelle und mit einem 15 1,5 in (3,8 cm) Teflon\*-Turbinen-Flügelrührer versehen war. Die Polymer-Lösung wurde dann dem PVA-Verarbeitungsmedium in der Weise zugesetzt, daß man dieses durch einen mit einem langen Stiel und mit einer 7 mm weiten Bohrung versehenen Trichter goß. Während dieses Zugabeschritts wurde die PVA-Lösung bei einer Geschwindigkeit von etwa 650 Upm gerührt. Nachdem die resultierende Öl-in-Wasser-Emulsion in dem 20 Harzessel etwa 10 min gerührt worden war, wurde der Inhalt des Harzessels in 3,5 l entionisiertes Wasser überführt, das in einem 4 l-Becher enthalten war und das bei etwa 800 Upm mit einem 2 in (5,1 cm) Flügelrührer aus rostfreiem Stahl gerührt wurde. Die resultierenden Mikrokapseln wurden in dem entionisierten Wasser etwa 30 min lang gerührt, durch Zentrifugation gewonnen, zweimal mit entionisiertem Wasser gewaschen, 25 um restlichen PVA zu entfernen, und wurden anschließend durch Gefriertrocknen gewonnen. Die Mikrokapsel-Produkte bestanden aus sphärischen Teilchen mit einem Durchmesser von etwa 1 bis 10  $\mu$ m.

Andere Mikrokapseln, beispielsweise solche Mikrokapseln, die Staphylococcen-Enterotoxin B enthalten, können in ähnlicher Weise hergestellt werden.

30

- Der TNP-KLH-Gehalt der mit dem Antigen beladenen Mikrokapseln, d.h. die Kernbeladung der Mikrokapseln, wurde bestimmt durch Auswiegen von 10 mg der mit dem Antigen beladenen Mikrokapseln in einem 12 ml-Zentrifugenröhrchen. Dem Röhrchen wurden 3,0 ml Methylenchlorid zugesetzt, und die Mischung wurde verwirbelt, um das
- 5 Poly-(DL-lactid-co-glycolid) zu lösen. Als nächstes wurden dem Röhrchen 3,0 ml entionisiertes Wasser zugesetzt und etwa 1 min lang kräftig verwirbelt. Der Inhalt des Zentrifugenröhrchens wurde zentrifugiert, um die organische Schicht und die wäßrige Schicht voneinander zu trennen. Die wäßrige Schicht wurde in einen 10 ml-Meßkolben überführt. Der Extraktionsschritt wurde wiederholt, und die wäßrigen Schichten wurden in dem
- 10 Meßkolben vereinigt. Der Meßkolben wurde bis zur Markierung mit entionisiertem Wasser aufgefüllt. Die Menge an TNP-KLH in dem Kolben und folglich die Menge an TNP-KLH in den Mikrokapseln wurde anschließend quantitativ unter Verwendung eines Protein-Assays gemessen. Die Mikrokapseln enthielten 0,2 Gew.-% TNP-KLH.
- 15 Der Gehalt an Staphylococcen-Enterotoxin B enthaltenden Mikrokapseln an Staphylococcen-Enterotoxin B kann quantitativ in ähnlicher Weise gemessen werden.

## **II. Eindringen der mit Farbstoff beladenen Mikrokapseln**

### **20 in die Peyer-Plaques nach oraler Verabreichung**

- Die bei weitem größte Gewebemasse mit der Fähigkeit, als induktive Stelle für sekretorische IgA-Antworten bzw. -Reaktionen zu wirken, sind die Peyer-Plaques. Diese abgeschlossenen Knötchen von lymphoretikularem Gewebe sind im Bereich der gesamten
- 25 Länge des Dünndarms und des Appendix angeordnet. Es wird derzeit angenommen, daß die zielgerichtete Abgabe von intaktem Antigen direkt an dieses Gewebe unter Erreichen einer hohen lokalen Konzentration das wirksamste Mittel zum Induzieren einer breiten IgA-Antwort bzw. -Reaktion im Schleimhaut-Bereich ist. Biologisch abbaubare Mikrokapseln stellen ein ideales Vehikel zum Erreichen der zielgerichteten Vaccine-Abgabe dar.

### Beispiel 1

#### Polystyrol-Mikrokapseln

Die Aufnahme von Mikrokapseln in den mit dem Darm verbundenen lymphoretikulären Geweben und die Größenbeschränkung dieses Eindringens wurde untersucht durch orale Verabreichung von Polystyrol-Mikrokapseln, die mit dem Fluoreszenz-Farbstoff Cumarin beladen waren, an Mäuse.

Nicht betäubten BALB/c-Mäusen, die keine Nahrung erhalten hatten, wurden 0,5 ml einer Suspension, die 100 mg/ml von mit fluoreszierendem Farbstoff beladenen Mikrokapseln verschiedener Größe (Durchmesser weniger als 5  $\mu\text{m}$  oder 8 bis 50  $\mu\text{m}$ ) enthielt, in Leitungswasser in den Magen unter Verwendung einer Einfüllnadel verabreicht. Zu verschiedenen Zeitpunkten nach der Verabreichung (0,5 h, 1 h und 2 h) wurden die Mäuse getötet, und der Dünndarm wurde herausgeschnitten. Es wurden 1 cm-Abschnitte des Darms isoliert, die diskrete Peyer-Plaques enthielten. Diese wurden vom Darminhalt freigespült, nach außen gekehrt und schnellgefroren. Die gefrorenen Abschnitte wurden präpariert und unter einem Fluoreszenzmikroskop untersucht. So wurde die Zahl, Stelle und Größe der Mikrokapseln angeschaut, die von den Peyer-Plaques aus dem Darmlumen aufgenommen worden waren.

20

Obwohl in gewissem Umfang das Einschließen der Mikrokapseln zwischen den Darmzotten (villi) deren Entfernen während des Spülens verhindert hatte, wurde ein Eindringen der Mikrokapseln in die Gewebe an Stellen außerhalb der Peyer-Plaques nicht beobachtet. Zum Zeitpunkt 0,5 h nach der oralen Verabreichung wurden Mikrokapseln in den Peyer-Plaques des proximalen, nicht jedoch in denen des distalen Abschnitts des Dünndarms beobachtet. Mit fortschreitender Zeit wurden die Mikrokapseln durch die peristaltische Bewegung weitertransportiert, so daß bis zum Zeitpunkt von 2 h nach der Verabreichung die Mikrokapseln im gesamten Bereich des Gastrointestinaltrakts vorhanden waren und in den Peyer-Plaques des Iliums gefunden werden konnten. Die endocytosierten Mikrokapseln waren vornehmlich im peripheren Bereich angeordnet, entfernt von der Spitze des Kopfes der Peyer-Plaques, was den Eindruck erweckte, daß das physikalische Einfangen

30

zwischen dem Kopf und den benachbarten Darmzotten (villi) während der peristaltischen Bewegung ihre Aufnahme unterstützt hatte. Ein Vergleich der Effizienz der Aufnahme der Mikrokapseln mit einem Durchmesser  $< 5 \mu\text{m}$  gegenüber den Zubereitungen mit Mikrokapseln mit einem Durchmesser von 8 bis  $50 \mu\text{m}$  zeigte, daß Mikrokapseln mit einem Durchmesser  $> 10 \mu\text{m}$  nicht von den Peyer-Plaques aufgenommen wurden, während Mikrokapseln mit einem Durchmesser von 1 bis  $10 \mu\text{m}$  schnell und selektiv aufgenommen wurden. Dies legte nahe, daß Mikrokapseln, die aus biologisch abbaubaren Wandungsmaterialien aufgebaut sind, als wirksames Mittel zur zielgerichteten Abgabe von Antigenen an die lymphoretikulären Gewebe zur Induktion von Immunität an Schleimhaut-Oberflächen dienen könnten.

## Beispiel 2

### Mikrokapseln aus einem Copolymer 85:15 Poly-(DL-lactid-co-glycolid)

1. Aufnahme biokompatibler und unter biologischen Bedingungen abbaubarer Mikrokapseln in die Peyer-Plaques

Gruppen von Mäusen wurde über ein Magenrohr unter biologischen Bedingungen abbaubare Mikrokapseln in Form einer Suspension in Leitungswasser verabreicht, die den Fluoreszenz-Farbstoff Cumarin-6 enthielten. Das Wandungsmaterial der Mikrokapseln, das für diese Studien ausgewählt wurde, bestand aus einem Copolymer aus 85:15 Poly-(DL-lactid-co-glycolid) aufgrund dessen Fähigkeit, einer signifikanten biologischen Erosion für eine Zeitdauer von sechs Wochen zu widerstehen. Zu verschiedenen Zeitpunkten vom Tag 1 bis zum Tag 35 nach der Verabreichung wurden bei einzelnen Mäusen drei repräsentative Peyer-Plaques, die mesenterischen Haupt-Lymphknoten und die Milz entfernt und verarbeitet, und es wurden gefrorene Reihen-Schnitte hergestellt. Bei Anschauen mit einem Fluoreszenzmikroskop unter Verwendung einer geeigneten Anregung sowie von Sperrfiltern zeigte das Cumarin eine tiefgrüne Fluoreszenz, die den visuellen Nachweis von Mikrokapseln mit einem Durchmesser von im wesentlichen weniger als  $1 \mu\text{m}$  erlaubte. Alle Schnitte wurden angeschaut, so daß die Gesamtzahl der Mikrokapseln in jedem Gewebe oder Organ quantitativ bestimmt werden konnte. Die Größe jeder nach



innen aufgenommenen Mikrokapsel wurde unter Verwendung eines kalibrierten Okular-Mikrometers bestimmt, und seine Anordnung innerhalb des Gewebes oder Organs wurde notiert.

- 5 Aufgenommene Mikrokapseln verschiedener Größen wurden in den Peyer-Plaques zum Zeitpunkt von 24 h nach der oralen Verabreichung und zu allen Zeitpunkten bis zu 35 Tage beobachtet, die dem Test unterworfen waren, wie dies in Tabelle 1 gezeigt ist. Zu keinem Zeitpunkt wurden Mikrokapseln irgendeiner Größe beobachtet, die in das Gewebe des Darms an irgendeinem anderen Punkt eingedrungen waren als bei den Peyer-Plaques.
- 10 Die Gesamtzahl der Mikrokapseln in den Peyer-Plaques stieg bis zum Tag 4 an und fiel dann über die folgenden 31 Tage bis zu einem Wert von etwa 15 % des zahlenmäßigen Peakwerts ab.

- Dies steht in Übereinstimmung mit der Beobachtung, daß freie Mikrokapseln auf der
- 15 Oberfläche der Darmzotten an den Zeitpunkten Tag 1, Tag 2 und Tag 4 beobachtet werden konnten. Es ist von Interesse, daß etwa 10 h im Anschluß an die orale Verabreichung der Mikrokapsel-Suspension die mit Cumarin beladenen Mikrokapseln im durchgegangenen Kot frei beobachtbar waren. Diese Freisetzung wurde mit Hilfe einer Ultraviolett-Lichtquelle verfolgt, und bis zum Zeitpunkt von 24 h nach der Aufnahme war
  - 20 der bei weitem größte Teil der aufgenommenen Mikrokapseln durchgegangen. So muß die kontinuierliche Aufnahme von Mikrokapseln in die Peyer-Plaques, die zum Zeitpunkt von 2 und 4 Tagen nach der Aufnahme beobachtet worden war, der geringeren Fraktion der aufgenommenen Dosis zugeschrieben werden, die innerhalb der Schleimhaut zwischen den Darmzotten eingeschlossen war. Darüberhinaus muß die Wirksamkeit der Aufnahme der
  - 25 eingeschlossenen Mikrokapseln um einige Größenordnungen größer sein als die der Mikrokapseln, die im Darmlumen, jedoch oberhalb der Schleimhaut-Schicht zugegen sind. Diese Beobachtungen sind wichtig, wenn diese Zahlen auf Menschen extrapoliert werden. Die ungeheuer viel größere Masse an Gewebe der Peyer-Plaques und die stark erhöhte Durchgangszeit für den Durchgang des Materials durch den Dünndarm des Menschen,
  - 30 verglichen mit dem der Maus, legt nahe, daß die Wirksamkeit der Aufnahme von Mikrokapseln in die Peyer-Plaques beim Menschen viel größer ist.

Mikrokapseln verschiedener Größen wurden innerhalb der Peyer-Plaques zu allen Test-Zeitpunkten beobachtet, wie in Tabelle 1 gezeigt ist. Zum Zeitpunkt des Tags 1, des Tags 2 und des Tags 4 blieb der Anteil von Mikrokapseln mit einem Durchmesser von  $< 2 \mu\text{m}$  (45 bis 47 %), der Mikrokapseln mit 2 bis  $5 \mu\text{m}$  Durchmesser (31 bis 35 %) und von  
5 Mikrokapseln mit einem Durchmesser  $> 5 \mu\text{m}$  (18 bis 23 %) relativ konstant. Offenkundig war nach 7 Tagen (und sogar noch stärker zu späteren Zeitpunkten) eine Verschiebung der Größenverteilung in der Weise, daß die kleinen ( $< 2 \mu\text{m}$ ) und mittleren (2 bis  $5 \mu\text{m}$ ) Mikrokapseln zahlenmäßig nicht mehr vorherrschend waren und die großen ( $> 5 \mu\text{m}$ ) Mikrokapseln zahlenmäßig die größte beobachtete Spezies wurden. Diese Verschiebung  
10 erfolgte gleichzeitig mit dem Rückgang der Gesamtzahl an Mikrokapseln in den Peyer-Plaques, die am und nach dem Tag 7 beobachtet wurde. Diese Ergebnisse stimmen überein mit der Beobachtung einer bevorzugten Abwanderung von Mikrokapseln der kleinen und mittleren Größen aus den Peyer-Plaques, während die großen Mikrokapseln ( $> 5 \mu\text{m}$ ) bevorzugt zurückgehalten werden.

15

Übereinstimmend mit der bevorzugten Abwanderung der kleinen und mittelgroßen Mikrokapseln aus den Peyer-Plaques sind die Daten, die den Ort der Mikrokapseln innerhalb des Aufbaus der Peyer-Plaques betreffen. Wenn eine Mikrokapsel innerhalb eines Peyer-Plaques beobachtet wurde, war dies entweder relativ nahe am Kopf-Epithel,  
20 wo sie in die Peyer-Plaques eintrat (innerhalb eines Bereichs von  $200 \mu\text{m}$ ) oder tiefer im lymphoiden Gewebe ( $\geq 200 \mu\text{m}$  vom nächsten identifizierbaren Kopf-Epithel entfernt) (Tabelle 1). Mikrokapseln, die tief im Gewebe der Peyer-Plaques beobachtet wurden, waren fast ausschließlich solche mit kleinem und mittlerem Durchmesser. Zum Zeitpunkt des Tags 1 nach der Verabreichung waren 92 % der Mikrokapseln nahe dem Kopf-Epithel  
25 angeordnet. Der Mengenanteil an tief im Gewebe angeordneten Mikrokapseln stieg bis zum Tag 4 auf 24 % der Gesamtmenge an und sank danach mit der Zeit bis auf etwa 2 % am Tag 14 und später. Die kleinen und mittelgroßen Mikrokapseln wandern also durch die Peyer-Plaques und aus diesen heraus, während die großen Mikrokapseln ( $> 5 \mu\text{m}$ ) für einen längeren Zeitabschnitt im Kopf-Bereich bleiben.

30

## 2. Mikrokapsel-Wanderung zu den mesenterischen Lymphknoten und zur Milz

Eine kleine Zahl Mikrokapseln wurde am Tag 1 nach der Verabreichung in den mesenterischen Lymphknoten beobachtet, und deren Zahl stieg zunehmend bis zum Tag 7, wie in  
5 Tabelle 2 gezeigt ist. Nach dem Tag 7 sanken die Zahlen, waren jedoch am Tag 35 noch bestimmbar. Die Größenverteilung zeigte klar, daß Mikrokapseln mit einem Durchmesser  $> 5 \mu\text{m}$  nicht in dieses Gewebe eintraten, und der höhere Anteil kleiner ( $< 2 \mu\text{m}$ ) relativ zu den mittelgroßen (2 bis  $5 \mu\text{m}$ ) Mikrokapseln zu den früheren Zeitpunkten zeigte, daß die Mikrokapseln mit kleinerem Durchmesser mit größter Effizienz zu diesem Gewebe  
10 wandern. Außerdem war zu den früheren Zeitpunkten die Mehrheit der Mikrokapseln gerade unterhalb der Kapsel in dem subkapsularen Sinus angeordnet. Zu späteren Zeitpunkten zeigte sich eine Verschiebung der Verteilung zu Stellen tief innerhalb der Lymphknoten-Struktur. Zum Zeitpunkt Tag 14 waren 90 % der Mikrokapseln innerhalb der Rinde und der medullaren Bereiche angeordnet. Die Beobachtung, daß die Mikrokapseln  
15 zuerst in dem subkapsularen Sinus oder nahe diesem entdeckt wurden, steht in Übereinstimmung mit deren Eintritt in dieses Gewebe über die Lymphgefäße, die den Ablauf der Peyer-Plaques bilden. Ein zunehmender Anstieg des Anteils der Mikrokapseln, die tief in diesem Gewebe angeordnet sind, wie er zum Zeitpunkt des Tags 4 deutlich wahrnehmbar ist, gefolgt von einem zunehmenden Abfall der Gesamtzahl am Tag 14 und später legt  
20 nahe, daß die Mikrokapseln durch dieses Gewebe hindurchwandern und über die efferente Lymphgefäß-Drainage herausgespült werden (\*).

Eine ähnliche Untersuchung der Milz zeigte, daß bis zum Tag 4 nach der Verabreichung keine Mikrokapseln nachweisbar waren. Eine Peakzahl an Mikrokapseln wurde in diesem  
25 Organ bis zum Tag 14 nicht beobachtet. Wie im Fall der mesenterischen Lymphknoten wurden keine Mikrokapseln eines Durchmessers von  $> 5 \mu\text{m}$  beobachtet. Zu allen Zeitpunkten wurden die Mikrokapseln tief in diesem Organ innerhalb der Rinde beobachtet. Es ist anzumerken, daß die Peakzahl an Mikrokapseln in der Milz zu einer Zeit beobachtet wurde, als die Mehrheit der Mikrokapseln, die in den mesenterischen Lymphknoten vorhanden waren, tief in diesen angeordnet war und ihre Gesamtzahl zurückging bzw.  
30 fiel. Diese Daten stehen in Übereinstimmung mit dem bekannten Muster der Lymphdrainage.

nage aus den Peyer-Plaques zu den mesenterischen Lymphknoten und von den mesenterischen Lymphknoten zum Blutstrom über den Thorax-Kanal. Es scheint also, daß die in der Milz vorhandenen Mikrokapseln durch die Peyer-Plaques und die mesenterischen Lymphknoten hindurchgewandert sind und in die Milz über den Blutkreislauf eingetreten  
5 sind.

In weiteren Experimenten wurden Gewebeschnitte aus Peyer-Plaques, mesenterischen Lymphknoten und Milz, die 85:15-DL-PLG-Mikrokapseln absorbiert enthielten, durch histochemische und immunohistochemische Verfahrensweisen untersucht. Neben anderen  
10 Beobachtungen zeigten diese Untersuchungen klar, daß die Mikrokapseln, die in den Peyer-Plaques absorbiert waren, innerhalb makrophagen-artiger Zellen vorlagen, die mit Periodsäure-Schiff's-Reagens (periodic acid Schiff's reagent; PAS) auf intracelluläres Kohlenhydrat, sehr wahrscheinlich Glycogen, und auf Haupthistokompatibilitätskomplex-Klasse II-Antigen (major histocompatibility complex (MHC) class II antigen) gefärbt  
15 wurden. Außerdem wurde allgemein gefunden, daß die in den mesenterischen Lymphknoten und in der Milz beobachteten Mikrokapseln dorthin innerhalb dieser für PAS und MHC-Klasse II positiven Zellen gebracht wurden. So wurden die Antigen enthaltenden Mikrokapseln durch Antigen präsentierende Zugangszellen (antigen-presenting accessory cells; APC) in die Peyer-Plaques eingeschleust, und diese APC haben die Antigen enthal-  
20 tenden Mikrokapseln an andere lymphoide Gewebe verbreitet.

Diese Daten zeigen, daß die Qualität der Immun-Antwort, die durch orales Verabreichen eines mikroverkapselten Impfstoffs induziert wird, durch die Größe der Teilchen gesteuert werden kann. Mikrokapseln eines Durchmessers  $< 5 \mu\text{m}$  werden aus den Peyer-Plaques  
25 innerhalb von APC ausgeschleust und setzen das Antigen in lymphoiden Geweben frei, die Induktionsstellen für systemische Immunreaktionen sind. Im Gegensatz dazu bleiben die Mikrokapseln mit einem Durchmesser von 5 bis  $10 \mu\text{m}$  in den Peyer-Plaques über längere Zeit, ebenfalls innerhalb von APC, und setzen das Antigen an diese sIgA-Induktionsstelle frei.

### Beispiel 3

#### Vergleich der Aufnahme von Mikrokapseln mit zehn Zusammensetzungen durch die Peyer-Plaques

5 Es wurden Experimente zum Identifizieren von Mikrokapsel-Polymerträgern durchgeführt, die nützlich für ein praktisches Abgabesystem mit kontrollierter Abgabe sein könnten und die die physikalisch-chemischen Eigenschaften besitzen, die eine gezielte Absorption von Mikrokapseln in mit Schleimhäuten verbundene lymphoide Gewebe erlauben. Im Hinblick auf die zuletzt genannte Überlegung hat die Forschung gezeigt, daß hydrophobe Teilchen  
10 von den Zellen des reticuloendothelialen Systems leichter phagocytiert werden. Daher wurde die Absorption von Mikrokapseln aus zehn verschiedenen Polymeren mit einer Größe von 1 bis 10  $\mu\text{m}$  in die Peyer-Plaques untersucht, die in Bezug auf die Hydrophobie einen Wert im selben Bereich zeigen. Die für diese Untersuchungen gewählten Wandungsmaterialien bestanden aus Polymeren, die in Bezug auf Wasseraufnahme, Abbau  
15 unter biologischen Bedingungen und Hydrophobie verschieden waren. Diese Polymere schlossen ein: Polystyrol, Poly-(L-lactid), Poly-(DL-lactid), 50:50 Poly-(DL-lactid-co-glycolid), 85:15 Poly-(DL-lactid-co-glycolid), Polyhydroxybuttersäure, Polymethylmethacrylat, Ethylcellulose, Celluloseacetat, Hydrogenphthalat und Cellulosetriacetat. Mikrokapseln, die aus sieben der zehn Träger hergestellt waren, wurden absorbiert und waren  
20 48 h nach oraler Verabreichung einer Suspension, die 20 mg Mikrokapseln enthielt, vornehmlich im Kopf-Bereich der Peyer-Plaques zugegen, wie in Tabelle 3 gezeigt ist. Es wurde nicht beobachtet, daß Mikrokapseln aus einem der vorstehenden Materialien in andere Gewebe als die Peyer-Plaques eintraten. Mit einer Ausnahme (Ethylcellulose) wurde gefunden, daß die Effizienz der Absorption mit der relativen Hydrophobie des  
25 Trägers korreliert. Bis zu 1.500 Mikrokapseln wurden in den drei repräsentativen Peyer-Plaques der Mäuse beobachtet, denen die am meisten hydrophobe Gruppe von Verbindungen [Polystyrol, Polymethylmethacrylat, Polyhydroxybutyrat] verabreicht worden war. Demgegenüber wurden 200 bis 1.000 Mikrokapseln bei den relativ weniger hydrophoben Polyestern beobachtet [Poly-(L-lactid), Poly-(DL-lactid), 85:15 Poly-(DL-lactid-co-glycolid), 50:50 Poly-(DL-lactid-co-glycolid)]. Als Klasse von Verbindungen wurden  
30 celluloseartige Materialien nicht absorbiert.

Es wurde gefunden, daß die charakteristischen physikalisch-chemischen Eigenschaften der Mikrokapseln die gezielte Ansteuerung der Mikrokapseln durch die Effizienz ihrer Absorption aus dem Darmlumen durch die Peyer-Plaques regulieren, und dies ist ein Oberflächenphänomen. Daher können Änderungen der charakteristischen Oberflächen-  
5 Eigenschaften der Mikrokapseln in Form chemischer Modifikationen des Polymers oder in Form von Überzügen dazu verwendet werden, die Effizienz zu regulieren, mit der die Mikrokapseln die Abgabe bioaktiver Mittel an mit der Schleimhaut verbundene lymphoide Gewebe und an APC steuern. Beispiele von Überzügen, die verwendet werden können, sind Chemikalien, Polymere, Antikörper, Bio-Haftmittel, Proteine, Peptide, Kohlenhydra-  
10 te, Lectine und dergleichen, und zwar sowohl natürlichen als auch synthetischen Ursprungs, sind jedoch nicht auf diese beschränkt.

### III. Mit mikroverkapselten Impfstoffen induzierte Antikörper-Antworten

15 Materialien und Verfahrensweisen:

#### Mäuse:

Es wurden in diesen Untersuchungen BALB/c-Mäuse mit einem Alter von 8 bis 12 Wochen verwendet.

20

#### Trinitrophenyl-Schlüsselloch-Napfschnecken-Hämocyanin

#### (Trinitrophenyl-Keyhole Limpet Hemocyanin; TNP-KLH):

Hämocyanin von Napfschnecken (KLH) *Megathura crenulata* wurde erhalten von der Firma Calbiochem (San Diego, CA). Es wurde mit dem Trinitrophenylhaptan (TNP-KLH)  
25 unter Verwendung von 2,4,6-Trinitrobenzolsulfonsäure nach der Verfahrensweise von Rittenburg und Amkraut konjugiert ("M.B. Rittenburg und A.A. Amkraut; Immunogenicity of trinitrophenyl-hemocyanin: Production of primary and secondary anti-hapten precipitins; J. Immunol. 97 (1966), 421"). Das Substitutionsverhältnis wurde spektrophotometrisch bestimmt zu TNP<sub>861</sub>-KLH, wofür man einen molaren Extinktionskoeffizienten  
30 von 15.400 bei einer Wellenlänge von 350 nm verwendete und eine 30 %ige Korrektur für den Beitrag von KLH bei dieser Wellenlänge berücksichtigte.

Staphylococcal-Enterotoxin B-Vaccine:

Eine formalinisierte Vaccine von Staphylococcal-Enterotoxin B (SEB) wurde in der Weise hergestellt, wie dies beschrieben wurde von Warren et al. ("J.R. Warren, L. Spero und J.F. Metzger; Antigenicity of formalin-inactivated staphylococcal enterotoxin B; J. Immunol. 111 (1973), 885"). Kurz gesagt, wurde 1 g Enterotoxin in 0,1 M Natriumphosphatpuffer (pH 7,5) zu einer Konzentration von 2 mg/ml gelöst. Formaldehyd wurde der Enterotoxin-Lösung zugegeben, um ein Formaldehyd : Enterotoxin-Molverhältnis von 4.300 : 1 zu erreichen. Die Lösung wurde in einen langsam schüttelnden Inkubator-Schüttler bei einer auf 37 °C kontrollierten Umgebung gestellt, und der pH-Wert wurde täglich überwacht und bei 7,5 + 0,1 gehalten. Nach 30 Tagen wurde das Toxoid konzentriert und unter Verwendung einer Druck-Filtrationszelle (Firma Amicon) in Borat-gepufferte Kochsalz-Lösung (borate buffered saline; BBS) gewaschen und durch Filtration sterilisiert. Die Umwandlung des Enterotoxins in das Enterotoxoid wurde bestätigt durch das Fehlen eines Gewichtsverlusts bei 3 bis 3,5 kg schweren Kaninchen, denen intramuskulär 1 mg des toxoidierten Materials injiziert wurde.

Immunisierung:

Mikroverkapselte und unverkapselte Antigene wurden in passender Konzentration in einer Lösung aus acht Teilen steril filtrierten Leitungswassers und zwei Teilen Natriumbicarbonat (7,5 %ige Lösung) suspendiert. Man ließ die zur Aufnahme vorgesehenen Mäuse während der Nacht fasten, bevor man ihnen 0,5 ml einer Suspension über Magen-Intubation verabreichte, die mit einer Intubationsnadel durchgeführt wurde ("J.L. Babb, H. Kiyono, S.M. Michalek und J.R. McGhee; LPS regulation of the immune response: Suppression of immune response to orally-administered T-dependent antigen; J. Immunol. 127 (1981), 1052").

Auffangen biologischer Flüssigkeiten:

## 1. Plasma:

Blut wurde in kalibrierten Kapillarpipetten im Anschluß an ein Punktieren des retro-orbitalen Plexus aufgefangen. Im Anschluß an die Gerinsel-Bildung wurde das Serum

abgenommen, zum Entfernen roter Zellen und Blutplättchen zentrifugiert, durch Hitze inaktiviert und bis zum Test bei -70 °C gelagert.

## 2. Darm-Sekretionen:

5 Mäusen wurden vier Dosen (0,5 ml) einer Spüllösung [25 mM NaCl, 40 mM Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 10 mM KCl, 20 mM NaHCO<sub>3</sub> und 48,5 mM Polyethylenglykol; Osmolarität 530 mosM] in Intervallen von 15 min verabreicht ("C.O. Elson, W. Ealding und J. Lefkowitz; A lavage technique allowing repeated measurement of IgA antibody on mouse intestinal secretions; J. Immunol. Meth. 67 (1984), 101"). 15 min nach der letzten Dosis der Spüllösung  
10 wurden die Mäuse betäubt, und nach weiteren 15 min wurde ihnen durch ip-Injektion 0,1 mg Pilocarpin verabreicht. Im Verlauf der nächsten 10 bis 20 min wurde eine Abgabe des Darm-Inhalts stimuliert. Dieser wurde in einer Petrischale aufgefangen, die 3 ml einer Lösung aus 0,1 mg/ml Sojabohnentrypsin-Inhibitor (Firma Sigma, St. Louis, MO) in 50 mM EDTA enthielt, wurde kräftig verwirbelt und anschließend zentrifugiert, um suspen-  
15 diertes Material zu entfernen. Die überstehende Flüssigkeit wurde in ein Rundboden-Polycarbonat-Zentrifugenrohr überführt, und es wurden 30 µl 20 mM Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF, Firma Sigma) zugesetzt, bevor durch Hochgeschwindigkeits-Zentrifugieren (27.000 x g; 20 min, 4 °C) geklärt wurde. Nach dem Klären wurden je 20 µl PMSF und 1 % Natriumazid zugesetzt, und es wurde eine 10 %ige Lösung in FCS  
20 hergestellt, um für ein alternatives Substrat für verbliebene Proteasen zu sorgen.

## 3. Speichel:

Parallel mit der Abgabe des Darm-Inhalts wurde ein großes Volumen an Speichel sekret-  
mäßig abgeschieden, und 0,25 ml wurden durch Kapillarwirkung in eine Pasteurpipette  
25 aufgezogen. 20 µl Trypsininhibitor, PMSF, Natriumazid und FCS wurden zugesetzt, bevor geklärt wurde.

## 4. Bronchial-Alveolen-Waschflüssigkeiten:

Bronchial-Alveolen-Waschflüssigkeiten wurden erhalten durch Spülen der Lungen mit 1,0  
30 ml PBS. Eine Tierfütternaedel wurde intratracheal eingeführt und an Ort und Stelle durch Binden mit Nahtmaterial fixiert. Die PBS wurde fünfmal eingefüllt und abgezogen und so



Waschflüssigkeiten erhalten. Diesen wurden 20 µl jeder der Substanzen Trypsininhibitor, PMSF, Natriumazid und FCS zugesetzt, bevor durch Zentrifugieren geklärt wurde.

#### 5. Immunochemische Reagenzien:

- 5 Festphasen-adsorbierte und durch Affinitätschromatographie gereinigte polyklonale Ziegen-IgG-Antikörper, spezifisch für IgM, IgG und IgA der Maus, wurden handelsüblich erhalten (Firma Southern Biotechnology Associates, Birmingham, AL). Ihre Spezifität in Radioimmunoassays wurde getestet durch ihre Fähigkeit zur Bindung passender gereinigter monoklonaler Antikörper und Myelom-Proteine.

10

#### 6. Festphasen-Radioimmunoassays:

- Gereinigte Antikörper wurden mit trägerfreiem Na<sup>125</sup>I (Firma Amersham) unter Anwendung des Chloramin T-Verfahrens markiert ("W.M. Hunter; Radioimmunoassay; In: Handbook of Experimental Immunology, Herausgeber: M. Weir; Blackwell Scientific Publishing, Oxford (1978), Seite 14.1"). Immulon-Removawell-Teststreifen (Firma Dyna-  
15 tech) wurden mit TNP konjugiertem Rinderserumalbumin (bovine serum albumin; BSA) oder Staphylococcen-Enterotoxin B in einer Menge von 1 µg/ml in BBS über Nacht bei 4 °C beschichtet. Kontrollstreifen ließ man unbeschichtet, jedoch wurden alle Streifen 2 h lang bei Raumtemperatur mit 1 % BSA in BBS geblockt, das als Verdünnungsmittel für  
20 alle Proben und mit <sup>125</sup>I-markierte Reagenzien verwendet wurde.

- Proben der biologischen Flüssigkeiten wurden in passender Weise verdünnt und in gewaschene Vertiefungen einer 3-Fach-Wiederholungs-Titerplatte gegeben. Dort wurden sie 6 h lang bei Raumtemperatur inkubiert. Nach dem Waschen wurden 100.000 cpm <sup>125</sup>I-  
25 markiertes Isotopen-spezifisches Anti-Immunglobulin jeder Vertiefung zugesetzt, und die Mischung wurde über Nacht bei 4 °C inkubiert. Im Anschluß an das Entfernen von nicht gebundenen <sup>125</sup>I-Antikörpern durch Waschen wurde der Inhalt der Vertiefungen in einem Gamma 5.500-Spektrometer (Firma Beckman Instruments, Inc., San Ramon, CA) ausgezählt. Im Fall der Tests auf TNP-spezifische Antikörper erfolgten Eichmessungen unter  
30 Verwendung von Reihen-2-Fach-Verdünnungen eines Standardserums (Firma Miles Scientific, Naperville, IL), die bekannte Mengen Immunglobuline enthielten, in Ver-

tiefungen, die mit 1  $\mu$ g/Vertiefung Isotopen-spezifischer Antikörper beschichtet waren. Eichkurven und eine Interpolation bekannter Werte wurde unter Einsatz eines Computers unter Verwendung von "Logit-log" oder "Four Parameter Logistic" BASIC Technology Center (Firma Vanderbilt Medical Center, Nashville, TN) erhalten. Im Fall von Antikörpern, die spezifisch für Staphylococcen-Enterotoxin B waren, sind die Ergebnisse angegeben als reziproke Serumverdünnung, die zu einem Signal führt, das größer ist als das 3-Fache der gruppenbezogenen Vormessung bei der gleichen Verdünnung (Endpunkt-Titration).

## 10                    **A. Vaccine-Mikrokapseln, verabreicht durch Injektion**

### **1. Hilfsmittel-Wirkung durch Mikroverkapselung**

#### **Beispiel 1**

#### 15                                    **Intraperitoneale Verabreichung**

Untersuchungen in unseren Laboratorien haben gezeigt, daß eine Mikroverkapselung in zahlreichen Experimental-Systemen zu einer stark erhöhten Immun-Antwort auf das eingeschlossene Antigen oder die eingeschlossene Vaccine führt. Ein Beispiel liefert der direkte Vergleich der Stärke und der Isotyp-Verteilung der umlaufenden Antikörper-Antwort auf Staphylococcen-Enterotoxin B (das Mittel, das eine Staphylococcen-Lebensmittelvergiftung hervorruft) im Anschluß an eine Immunisierung entweder mit löslichem oder mit mikroverkapseltem Enterotoxoid.

25    Gruppen von Mäusen wurden verschiedene Dosen der Toxoid-Vaccine verabreicht, die in 50:50 Poly-(DL-lactid-co-glycolid)-Mikrokapseln eingearbeitet war oder die in löslicher Form vorlag. Dies geschah durch intraperitoneale (IP) Injektion. An den Tagen 10 und 20 nach der Immunisierung wurden Plasmaproben abgenommen und durch Endpunkt-Titration in Isotyp-spezifischen immunoradiometrischen Tests (Tabelle 4) auf Antitoxin-Aktivität getestet.

30

Die optimale Dosis an löslichem Toxoid (25  $\mu\text{g}$ ) erbrachte eine charakteristisch schwache Immun-Antwort auf das Toxin, das nur im IgM-Isotyp nachgewiesen wurde. Im Gegensatz dazu induzierte die Verabreichung von 25  $\mu\text{g}$  Toxoid, das in Mikrokapseln eingearbeitet war, nicht nur eine IgM-Immun-Antwort, sondern auch eine IgG-Immun-Antwort, die nachweisbar war bei einer Plasma-Verdünnung von 1/2.560 am Tag 20 nach der Immunisierung. Außerdem konnten größere Toxoid-Dosen in mikroverkapselter Form verabreicht werden, ohne die Größe der Immun-Antwort zu senken, wie dies bei der 50  $\mu\text{g}$ -Dosis des löslichen Toxoids gefunden wurde. Tatsächlich erlaubt die gemessene Freisetzung, die mit den Mikrokapseln erreicht wurde, die Verabreichung der 4- bis 5-fachen Dosis, ohne daß eine hohe Zonen-Paralyse hervorgerufen wurde, was zu einer wesentlich erhöhten Immunität führt. Die Hilfsmittel-Aktivität ist noch ausgeprägter im Anschluß an eine Sekundär-Immunisierung (Tabelle 5) und eine Tertiär-Immunisierung (Tabelle 6).

Am Tag 20 war die Antitoxin-Antwort im Anschluß an eine Sekundär-Immunisierung 512 mal höher bei Mäusen, die 50  $\mu\text{g}$  mikroverkapseltes Toxoid erhalten hatten, als bei Mäusen, die die optimale Dosis löslichen Toxoids erhalten hatten. Außerdem war eine Tertiär-Immunisierung mit dem löslichen Toxoid in optimaler Dosis zur Erhöhung einer Antikörper-Antwort auf das Toxin erforderlich, die äquivalent der Immunisierung war, die im Anschluß an eine einzige Immunisierung mit 100  $\mu\text{g}$  des mikroverkapselten Enterotoxoids beobachtet wurde. Eine Hilfsmittel-Wirkung gleicher Größenordnung wurde dokumentiert gegenüber üblichen Laborprotein-Antigenen wie beispielsweise Hapten-gebundenem Schlüsselloch-Napfschnecken-Hämocyanin und Influenzavirus-Vaccine.

## Beispiel 2

### Subkutane Verabreichung

Das vorliegende Abgabesystem war entsprechend den Ergebnissen aktiv im Anschluß an eine intramuskuläre oder subkutane (SC) Injektion. Dies wurde untersucht, indem man direkt den Zeitverlauf und die Stärke der Immun-Antwort im Anschluß an eine IP-Injektion und eine SC-Injektion bei Gruppen von Mäusen verglich, wie dies in Tabelle 7 gezeigt ist.

100  $\mu\text{g}$  Enterotoxoid in Mikrokügelchen, die durch SC-Injektion an vier Stellen entlang dem Rücken von Mäusen verabreicht wurden, stimulierte eine Peak-IgG-Antitoxin-Antwort, die äquivalent der war, die im Anschluß an eine IP-Injektion beobachtet wurde. Es wurde dieselbe Verzögerung der Kinetik des Auftretens von Antitoxin beobachtet. Es wurden jedoch ausgezeichnete Antikörper-Konzentrationen erhalten, was die Nützlichkeit einer Injektion an anderen Stellen als im Peritoneum (Bauchfell) demonstriert. Im Anschluß an eine Sekundär-Immunisierung waren die Verabreichungswege IP und SC ebenfalls äquivalent im Hinblick auf den Peak-Titer, obwohl die verzögerte Antwort bei Verabreichung auf dem SC-Weg erneut offenkundig war, wie in Tabelle 8 gezeigt ist.

10

## **2. Mechanismus der Hilfsmittel-Wirkung durch Mikroverkapselung**

### **Beispiel 1**

#### **Die durch Mikroverkapselung erreichte Wirkung ist nicht das**

15 **Ergebnis einer Hilfsmittel-Aktivität, die auf das Polymer zurückzuführen ist**

Bei Überlegungen zum Mechanismus, durch den Mikrokügelchen aus DL-PLG einer Größe von 1 bis 10  $\mu\text{m}$  eine potenzierte humorale Immun-Antwort auf das verkapselte Antigen vermitteln, müssen drei Mechanismen als möglich in Betracht gezogen werden.

20 Zum einen mag die chronische Langzeit-Freisetzung (Depot), verglichen mit einer Bolus-Dosis bzw. geballt auftretenden Dosis an unverkapseltem Antigen, eine Rolle bei der Verstärkung der Immun-Antwort spielen. Zum zweiten haben unsere Experimente gezeigt, daß Mikrokügelchen in diesem Größenbereich leicht durch Antigen-Verarbeitung und Kontakt mit den Zellen phagocytiert werden. Daher muß auch die gezielte Abgabe einer vergleichsweise großen Dosis nicht-abgebauten Antigens direkt an die Zellen, die für die  
25 Initiierung der Immun-Antworten auf T-Zellen-abhängige Antigene verantwortlich sind, in Betracht gezogen werden. Zum Dritten können die Mikrokapseln eine eigene immunpotenzierende Aktivität über ihre Fähigkeit zur Aktivierung von Zellen des Immunsystems in einer Weise besitzen, die analog der von Hilfsstoffen wie Bakterien-Lipopolysaccharid  
30 oder Muramyldipeptid ist. Eine Immunpotenzierung durch diesen letztgenannten Mecha-

nismus hat die charakteristische Eigenschaft, daß sie ihren Ausdruck findet, wenn der Hilfsstoff gleichzeitig mit dem Antigen verabreicht wird.

Um zu testen, ob Mikrosphären eine eigene unterstützende Wirkung besitzen, die durch die Fähigkeit dieser Teilchen vermittelt wird, das Immunsystem nicht spezifisch zu aktivieren, wurde die Antikörper-Antwort auf 100 µg mikroverkapselten Enterotoxoids verglichen mit derjenigen, die im Anschluß an die Verabreichung einer gleichen Dosis Enterotoxoid induziert wurde, das mit Placebo-Mikrokügelchen gemischt war, die kein Antigen enthielten. Die verschiedenen Antigen-Formen wurden durch IP-Injektionen an Gruppen von 10 BALB/c-Mäusen verabreicht, und die IgM- und IgG-Entertoxin-spezifischen Antikörper-Antworten im Plasma wurden durch Endpunkt-Titrations-RIA bestimmt, wie in Tabelle 9 gezeigt ist.

Die Antikörper-Antwort im Plasma auf eine Bolus-Injektion der optimalen Dosis von löslichem Enterotoxoid (25 µg) war charakteristisch schwach und bestand aus einem Peak-IgM-Titer von 800 am Tag 10 und einem Peak-IgG-Titer von 800 am Tag 20. Eine Verabreichung einer gleichen Dosis an mikroverkapseltem Enterotoxoid induzierte eine starke Immun-Antwort sowohl bei dem IgM-Isotyp als auch bei dem IgG-Isotyp, die selbst am Tag 30 nach der Immunisierung noch anstieg. Eine gemeinsame Verabreichung von löslichem Enterotoxoid und einer Dosis von Placebo-Mikrokügelchen mit gleichem Gewicht, gleicher Größe und gleicher Zusammensetzung wie diejenigen, die bei der Verabreichung von verkapseltem Antigen verwendet worden waren, induzierte keine Antitoxin-Immun-Antwort im Plasma, die signifikant höher war als diejenige, die durch das lösliche Antigen allein induziert wurde. Dieses Ergebnis änderte sich nicht durch die Verabreichung des löslichen Antigens einen Tag vor oder 1, 2 oder 5 Tage nach der Verabreichung der Placebo-Mikrokügelchen. Diese Daten zeigen also, daß die Immunpotenzierung, die dann stattfindet, wenn ein Antigen in 1 bis 10 µm großen DL-PLG-Mikrosphären verabreicht wird, nicht eine Funktion des Vermögens der Mikrokügelchen ist, aus eigenem Antrieb das Immunsystem zu aktivieren. Vielmehr sind die Daten in Übereinstimmung mit der Interpretation entweder einer Depot-Wirkung, einer gezielten

Abgabe des Antigens an Antigen präsentierende Zugangszellen oder einer Kombination dieser beiden Mechanismen.

### Beispiel 2

5        **Eine Verlangsamung der Antigen-Freisetzungsgeschwindigkeit aus Mikro-**  
         **kapseln einer Größe von 1 bis 10  $\mu\text{m}$  erhöht das Level der Antikörper-**  
         **Antwort und verzögert den Zeitpunkt des Peakwerts der Antwort**

Vier Enterotoxoid enthaltende Mikrokapsel-Zubereitungen mit unterschiedlichen Antigen-  
10    Freisetzungsraten wurden im Hinblick auf ihre Fähigkeit zur Induzierung einer Antitoxin-  
     Antwort im Plasma im Anschluß an eine IP-Injektion verglichen. Die Rate der Antigen-  
     Freisetzung durch die Mikrokapseln, die in dieser Studie verwendet wurden, ist eine  
     Funktion zweier Mechanismen, nämlich der Diffusion durch Poren in der Wandungs-  
     matrix und der Hydrolyse (Bioerosion) der Wandungsmatrix.

15    Die Chargen # 605-026-1 und # 514-140-1 weisen verschiedene Anfangs-Freisetzungsraten  
     durch Poren auf, gefolgt von einer zweiten Freisetzungsstufe, die eine Funktion ihres  
     Abbaus durch Hydrolyse ist. Im Gegensatz dazu wurden die Chargen # 697-143-2 und  
     # 928-060-00 mit einer dichten einheitlichen Matrix eines Wandungsmaterials hergestellt,  
20    das in nur geringem Umfang eine Freisetzung durch Poren ermöglicht, und die Freiset-  
     zung durch diese Materialien ist im wesentlichen eine Funktion der Geschwindigkeit, mit  
     der die Wandungsmaterialien hydrolysiert werden. Die zwei letztgenannten Chargen  
     unterscheiden sich jedoch in ihrem Verhältnis von Lactid zu Glycolid, aus dem die  
     Mikrokapseln aufgebaut sind, und die größere Beständigkeit des Materials 85:15 DL-PLG  
25    gegenüber Hydrolyse führt zu einer langsameren Geschwindigkeit der Enterotoxoid-  
     Freisetzung.

Die durch die Chargen # 605-026-1 induzierte Immun-Antwort (60 % Freisetzung zum  
Zeitpunkt von 48 h) führte zum Erreichen eines Peakwerts des IgG-Titers von 6.400 am  
30    Tag 20 (Tabelle 10). Die Chargen # 514-140-1 (30 % Freisetzung zum Zeitpunkt von 48  
     h) stimulierte IgG-Antikörper, deren Konzentration ebenfalls einen Peakwert am Tag 20

erreichte, die jedoch in höherer Konzentration sowohl am Tag 20 als auch am Tag 30 zugegen waren.

5 Eine Immunisierung mit Chargen # 697-143-2 (10 % Freisetzung zum Zeitpunkt 48 h) führte zu Peakwerten des IgG-Antikörpers am Tag 30 und am Tag 45, die wesentlich höher waren (102.400) als die Werte, die durch eine der beiden Chargen mit früher Freisetzung induziert wurden. Außerdem verzögert eine Verzögerung der Geschwindigkeit der Antigen-Freisetzung durch Verwendung eines 85:15-Verhältnisses von Lactid:Glycolid (Chargen # 928-060-00; 0 % Freisetzung zum Zeitpunkt 48 h) die Peakwerte der Antikörper-Konzentration bis zum Tag 45 und 60; es wurde jedoch kein weiterer Anstieg der Immunpotenzierung beobachtet.

15 Diese Ergebnisse sind in Übereinstimmung mit einer verzögerten und fortdauernden Freisetzung von Antigen, die eine höhere Antikörper-Antwort stimuliert. Jedoch zeigen bestimmte Aspekte des Musters der Antworten, die durch diese verschiedenen Mikrokügelchen induziert wurden, daß eine Depot-Wirkung nicht der einzige Mechanismus der Immunpotenzierung ist. Je schneller die anfängliche Freisetzung ist, desto niedriger ist der Peakwert des Antikörper-Titers. Diese Ergebnisse sind in Übereinstimmung mit einem Modell, bei dem das Antigen, das innerhalb der ersten 48 h durch Diffusion durch die Poren freigesetzt wird, nicht effizienter ist als die Verabreichung des löslichen Antigens.

20 Eine signifikante Verzögerung des Anspringens der Freisetzung, bei der Zeit für die Phagocytose der Mikrosphären durch Makrophagen eingeräumt wird, ermöglicht das effiziente Verarbeiten und Präsentieren des Antigens, und die Höhe der resultierenden Antwort wird durch die Antigen-Menge bestimmt, die an die präsentierenden Zellen abgegeben wird.

25 Jedoch führt eine Verzögerung der Antigen-Freisetzung über den Zeitpunkt hinaus, zu dem das gesamte Antigen an die präsentierenden Zellen abgegeben ist, nicht zu einer weiteren Potenzierung der Immun-Antwort, sondern schiebt nur den Peakwert hinaus.

### **3. Pulsartige Freisetzung von Vaccinen aus Mikrokapseln für eine programmierte Verstärkung im Anschluß an eine Einzelinjektion**

Wenn man eine aus einer Anzahl von Vaccinen durch Injektion erhält, sind zwei oder drei  
5 oder mehr Verabreichungen der Vaccine erforderlich, um zu einer guten Immun-Antwort  
zu führen. Typischerweise wird die erste Injektion verabreicht, um eine erste Antwort zu  
induzieren; die zweite Injektion wird verabreicht, um eine Sekundär-Antwort zu induzie-  
ren; und eine dritte Injektion wird verabreicht, um eine Tertiär-Antwort zu induzieren.  
Mehrere Injektionen sind erforderlich, da eine wiederholte Wechselwirkung des Antigens  
10 mit den Zellen des Immunsystems erforderlich ist, um eine starke immunologische  
Antwort zu stimulieren. Nach Erhalten der ersten Vaccine-Injektion muß daher ein Patient  
zum Arzt mehrere Male zurückkommen, um eine zweite, eine dritte und weitere Injektio-  
nen zu erhalten, um Schutz zu erwerben. Häufig kehren die Patienten nie mehr zu dem  
Arzt zurück, um Folge-Injektionen zu erhalten.

15 Die Vaccine-Formulierung, die einem Patienten injiziert wird, kann aus einem Antigen,  
zusammen mit einem Hilfsstoff bestehen. Beispielsweise kann ein Antigen an Alaun  
gebunden sein. Während der ersten Injektion ist die Verwendung der Antigen-Hilfsstoff-  
Kombination insofern wichtig, als der Hilfsstoff zur Stimulierung einer Immun-Antwort  
20 beiträgt. Während der zweiten und der dritten Injektion verbessert die Verabreichung des  
Antigens die Immun-Antwort des Körpers auf das Antigen. Die zweite Verabreichung und  
die dritte Verabreichung oder nachfolgende Verabreichungen erfordern jedoch nicht  
notwendigerweise die Verwendung eines Hilfsstoffs. Die Firma Alza Corporation hat  
Verfahrensweisen zur kontinuierlichen Freisetzung eines Antigens und eines immunpo-  
25 tenzierenden Mittels (immunopotentiator) (Hilfsstoffs) zur Stimulierung einer Immun-  
Antwort beschrieben (US-Patent Nr. 4,455,142). Die vorliegende Erfindung unterscheidet  
sich von dem Alza-Patent in wenigstens zwei wichtigen Punkten. Zum einen ist ein  
immunpotenzierendes Mittel (immunopotentiator) zur Erhöhung der Immun-Antwort nicht  
erforderlich; zum zweiten wird das Antigen nicht kontinuierlich aus dem Abgabesystem  
30 freigesetzt.



Die vorliegende Erfindung betrifft die Formulierung einer Vaccine (Antigen) in Mikrokapseln (oder Mikrosphären), wodurch das Antigen in unter biologischen Bedingungen abbaubaren Polymeren eingekapselt ist, z.B. Poly-(DL-lactid-co-glycolid). Noch genauer gesagt, werden verschiedene Vaccine-Mikrokapseln hergestellt und dann miteinander  
5 gemischt, so daß eine einzige Injektion der Vaccine-Kapsel-Mischung die primäre Immun-Antwort verbessert und anschließend Antigen in pulsartiger Weise zu späteren Zeitpunkten abgibt, um eine Sekundär-Antwort, eine Tertiär-Antwort und nachfolgende Antworten zu bewirken.

- 10 Die Mischung der Mikrokapseln besteht aus kleinen und großen Mikrokapseln. Die kleinen Mikrokapseln mit einem Durchmesser unter  $10\text{ }\mu\text{m}$  (Micron), vorzugsweise mit einem Durchmesser unter  $5\text{ }\mu\text{m}$  oder noch mehr bevorzugt von 1 bis  $5\text{ }\mu\text{m}$ , potenzieren die Primär-Antwort (ohne die Notwendigkeit der Gegenwart eines Hilfsstoffs), da die kleinen Mikrokapseln in effizienter Weise erkannt und von Makrophagen aufgenommen  
15 werden. Die Mikrokapseln innerhalb der Makrophagen setzen dann das Antigen frei, das nachfolgend verarbeitet und auf der Oberfläche des Makrophagen präsentiert wird, was die Primär-Antwort ergibt. Die größeren Mikrokapseln mit einem Durchmesser größer als  $5\text{ }\mu\text{m}$ , vorzugsweise mit einem Durchmesser größer als  $10\text{ }\mu\text{m}$ , jedoch nicht so groß, daß sie beispielsweise durch Injektion nicht verabreicht werden können, vorzugsweise mit  
20 einem Durchmesser unter  $250\text{ }\mu\text{m}$ , werden mit unterschiedlichen Polymeren hergestellt, so daß sie in unterschiedlichen Geschwindigkeiten biologisch abgebaut werden, und sie setzen Antigen in pulsartiger Weise frei.

- Unter Verwendung der vorliegenden Erfindung ist die Zusammensetzung der Antigen-  
25 Mikrokapseln für die Primär-Antwort grundsätzlich dieselbe wie die Zusammensetzung der Antigen-Mikrokapseln, wie sie für die Sekundär-Antwort, die Tertiär-Antwort und nachfolgende Antworten verwendet werden. Mit anderen Worten: Das Antigen wird in dieselbe Klasse von unter biologischen Bedingungen abbaubaren Polymeren eingekapselt. Die Größe und die für eine pulsartige Freisetzung relevanten Eigenschaften der Antigen-  
30 Mikrokapseln maximiert anschließend die Immun-Antwort auf das Antigen.

Die bevorzugten, unter biologischen Bedingungen abbaubaren Polymere sind diejenigen, deren Abbau-Raten unter biologischen Bedingungen mehr oder weniger dadurch variiert werden können, daß man ihr Monomer-Verhältnis verändert, beispielsweise Poly-(DL-lactid-co-glycolid), so daß Antigen-Mikrokapseln, wie sie für die Sekundär-Antwort verwendet werden, unter biologischen Bedingungen schneller abgebaut werden als Antigen-Mikrokapseln, wie sie für die nachfolgenden Antworten verwendet werden, was eine pulsartige Freisetzung des Antigens ergibt. Zusammengefaßt kann man durch Steuerung der Größe der Mikrokapseln mit grundsätzlich derselben Zusammensetzung die Immun-Antwort auf das Antigen maximieren. Ebenfalls wichtig ist, daß man kleine Mikrokapseln (Mikrokapseln mit einem Durchmesser unter 10  $\mu\text{m}$ , vorzugsweise unter 5  $\mu\text{m}$ , am meisten bevorzugt von 1 bis 5  $\mu\text{m}$ ) in der Mischung aus Antigen-Mikrokapseln hat, um die Primär-Antwort zu maximieren. Die Verwendung eines die Immun-Antwort verstärkenden Abgabesystems, wie beispielsweise die Verwendung kleiner Mikrokapseln, wird noch wichtiger, wenn man versucht, eine Immun-Antwort auf weniger immunogene Verbindungen zu bewirken, wie beispielsweise auf abgetötete Vaccinen, Untereinheit-Vaccinen, Vaccinen mit niedrigem Molekulargewicht wie beispielsweise Peptide und dergleichen.

### Beispiel 1

#### 20 Gemeinsame Verabreichung von freier und mikroverkapselter Vaccine

Es wurde eine Vaccine (Firma Biken) gegen das japanische Encephalitis-Virus untersucht. Das verwendete Virus war ein Produkt der Research Foundation for Microbial Diseases der Osaka University, Suita, Osaka, Japan. Der Hersteller empfiehlt eine aus drei Dosen zusammengesetzte Immunisierungs-Reihe, die aus zwei Dosen der Vaccine besteht, die im Abstand von 1 bis 2 Wochen verabreicht werden, gefolgt von der Verabreichung einer dritten Dosis der Vaccine einen Monat nach der anfänglichen Immunisierungs-Reihe.

Es wurden die antiviralen Immun-Antworten von Mäusen, die mit einem aus drei Dosen bestehenden Standard-Plan der JE-Vaccine immunisiert worden waren, mit der antiviralen Antwort von Mäusen verglichen, die unter Verabreichung einer einzelnen Dosis der JE-

Vaccine immunisiert worden waren, die aus einem Teil unverkapselter Vaccine und zwei Teilen verkapselter Vaccine bestand. Die JE-Mikrokapseln hatten einen Durchmesser von  $> 10 \mu\text{m}$ . Die Ergebnisse der Immunisierung der Mäuse mit JE-Vaccine durch diese beiden Verfahrensweisen wurden verglichen durch Messen der Titer der Antikörper gegen  
5 JE-Vaccine im Serum, nachgewiesen über einen ELISA-Assay. Der ELISA-Assay mißt das Vorhandensein von Serum-Antikörpern mit Spezifität für JE-Vaccine-Komponenten; er mißt jedoch nicht die Konzentration an den Virus neutralisierendem Antikörper, der im Serum zugegen ist. Die den Virus neutralisierende Antikörper-Aktivität wurde daher gemessen durch Assays der Inhibierung der cytopathischen Wirkung des Virus (cytopathic  
10 effect (CPE) inhibition) und Virus-Plaque-Reduktions-Assays. Die Ergebnisse dieser Assays werden nachfolgend präsentiert.

Es wurden Experiment-Gruppen untersucht, die bestanden aus

- (1) unbehandelten Kontroll-Mäusen, die keine Immunisierungs-Behandlung erhielten;
- 15 (2) Mäusen, die 3,0 mg JE-Vaccine (unverkapselt) am Tag 0 erhielten;
- (3) Mäusen, die 3,0 mg JE-Vaccine (unverkapselt) an den Tagen 0, 14 und 42 erhielten (Standard-Plan); und
- (4) Mäusen, die 3,0 mg JE-Vaccine (unverkapselt) und 3,0 mg JE-Vaccine (verkapselt) am Tag 0 erhielten.

20

Die unbehandelten Kontrolltiere liefern einen Grund-Virus-Neutralisations-Titer, mit dem die immunisierten Tiere verglichen werden können. Die Tiere, die eine einzige Dosis von 3,0 mg JE-Vaccine am Tag 0 erhielten, liefern Grund-Neutralisations-Titer, mit denen die Tiere verglichen werden können, die unverkapselte Vaccine zusammen mit verkapselter  
25 Vaccine erhielten. Dieser Vergleich liefert den Beweis dafür, daß die Verabreichung verkapselter Vaccine das Immunisierungspotential einer einzelnen 3,0 mg-Dosis unverkapselter Vaccine erhöht. Die Tiere, die drei Dosen unverkapselte Vaccine erhielten, dienen als Kontrolle, mit der die Gruppe, die die verkapselte Vaccine erhielt, verglichen werden kann, so daß damit das Vermögen einer einzigen, sowohl aus unverkapselter als  
30 auch verkapselter Vaccine bestehenden Injektion zur Produktion antiviraler Aktivität

dokumentiert werden kann, die einem aus drei Dosen bestehenden Standard-Immunisierungsplan vergleichbar ist.

Serumproben, die an den Tagen 21, 49 und 77 von zehn Tieren in jeder Experiment-Gruppe abgenommen worden waren, wurden auf ihr Vermögen getestet, die cytopathischen Effekte zu inhibieren, die durch eine Standardgabe (100 TCID<sub>50</sub>) JE-Virus induziert worden waren. Die Ergebnisse der CPE-Inhibierungs-Assays, ausgedrückt als die höchste Serumverdünnung, die 50 % des viralen CPE zu inhibieren vermag, sind in Tabelle 11 angegeben.

Wie gezeigt, hatten die unbehandelten Kontrolltiere (Gruppe 1) keine signifikante Virus-Neutralisations-Aktivität im Serum an den getesteten Punkten. Von den zehn Tieren, die eine einzige 3,0 mg-Dosis JE-Vaccine am Tag 0 erhielten (Gruppe 2) entwickelte eines keine nachweisbaren, den Virus neutralisierenden Antikörper. Von den verbleibenden neun Mäusen war der höchste erreichte Titer 254 und trat am Tag 49 auf. Der geometrische mittlere Antivirus-Titer für diese Experiment-Gruppe hatte einen Peak am Tag 49. Von den zehn Tieren, die einen Standard-Plan von drei Vaccine-Dosen erhielten (Gruppe 3), zeigen acht einen Rückgang der Antikörper-Aktivität vom Tag 49 bis zum Tag 77. Der geometrische mittlere Titer für diese Gruppe ging um mehr als 50 % vom Tag 40 bis zum Tag 77 zurück.

Alle zehn Tiere, die verkapselte JE-Vaccine erhalten hatten (Gruppe 4), entwickelten antivirale Aktivität im Serum. Der geometrische mittlere Titer für diese Gruppe stieg vom Tag 21 bis zum Tag 77. Der mittlere Titer am Tag 49 in dieser Gruppe war signifikant niedriger als derjenige, der in der mit drei Vaccine-Dosen immunisierten Gruppe aufgetreten war (Gruppe 3) ( $p = 0,006$ ). Jedoch stieg der Titer kontinuierlich vom Tag 49 bis zum Tag 77 an, was entgegengesetzt zum Erscheinungsbild bei der mit drei Vaccine-Dosen immunisierten Gruppe war. Es gab keinen signifikanten Unterschied im mittleren Titer für diese beiden Gruppen in den Proben vom Tag 77 ( $p = 0,75$ ). Dies zeigt, daß die mit verkapselter Vaccine immunisierte Gruppe vergleichbare Antivirus-Titer im Serum am Tag 77 erreichte. Im Unterschied zu der mit Vaccine-Dosen immunisierten Gruppe

(Gruppe 3) zeigten die Tiere, die verkapselte Vaccine erhalten hatten (Gruppe 4), kontinuierliche Anstiege der Virus-Neutralisations-Aktivität im Serum über die im Rahmen der Prüfung untersuchten Zeitpunkte. Im Gegensatz zu der mit einer Standard-Vaccine-Behandlung immunisierten Gruppe zeigten Mäuse, die verkapselte JE-Vaccine erhalten hatten, einen zweifachen Anstieg im mittleren Serum-Neutralisations-Titer vom Tag 49 bis zum Tag 77.

Der mittlere Antivirus-Titer am Tag 21 von Mäusen, die mikroverkapselte Vaccine erhalten hatten, war nicht signifikant verschieden vom mittleren Titer am Tag 21 von Mäusen, die am Tag 0 eine einzige Dosis JE-Vaccine erhalten hatten ( $p = 0,12$ ). Jedoch waren die mittleren Titer am Tag 49 und am Tag 77 für die beiden Gruppen signifikant verschieden ( $p = 0,03$  bzw.  $p = 0,03$ ). Diese Ergebnisse zeigen, daß Virus-Neutralisations-Titer im Serum, die ähnlich denen sind, die durch eine Standard-Vaccine-Verabreichung hervorgerufen werden, durch Verabreichung einer einzigen Dosis verkapselter JE-Vaccine erreicht werden können. Obwohl die Antivirus-Titer, die mit der Trägerformulierung erreicht wurden, die in dieser Untersuchung verwendet worden war, nicht so schnell anstiegen, wie diejenige, die mit der Standard-Vaccine erhalten worden waren, erreichte die neutralisierende Antikörper-Aktivität im Serum Titer, die mit denen vergleichbar sind, die mit dem Standard-Plan unter Verabreichung von drei Vaccine-Dosen erreicht wurden.

Um diese Ergebnisse weiter zu erhärten, wurden gepoolte Proben, die hergestellt worden waren durch Mischen gleicher Volumenmengen jeder Serumprobe, für jede Experiment-Gruppe hergestellt. Diese Proben wurden einem unabhängigen Labor zur Bestimmung der Antivirus-Aktivität übersandt. Die Proben wurden mittels des Plaque-Reduktions-Assays gegen eine Standard-Immunisierung durch JE-Virus getestet. Die Ergebnisse dieser Assays sind in Tabelle 12 angegeben und belegen die oben beschriebenen Ergebnisse. Obwohl die Tiere, die verkapselte Vaccine erhalten hatten, die Spitzen-Titer nicht so schnell wie die mit Standard-Vaccine behandelte Gruppe erreichten, induzierte die verkapselte Vaccine eine vergleichbare Viren-neutralisierende Antikörper-Aktivität. Außerdem hielt die verkapselte Vaccine einen höheren Antivirus-Titer über einen längeren Zeitraum aufrecht,

als dies die Standard-Vaccine tat. Diese Ergebnisse stützen weiter den Schluß, daß eine Einzelverabreichung von mikroverkapselter Vaccine zu Ergebnissen führen kann, die vergleichbar mit denen sind, die mit einem aus drei Dosen Standard-Vaccine bestehenden Verabreichungsplan erreicht wurden.

5

### Beispiel 2

#### **Gemeinsame Verabreichung von Vaccine-Mikrokapseln mit einem Durchmesser $< 10 \mu\text{m}$ und $> 10 \mu\text{m}$**

- 10 Ein Vorteil des Copolymer-Mikrokapsel-Abgabesystems ist das Vermögen, die Zeit und/oder Geschwindigkeit zu steuern, mit der das eingearbeitete Material freigesetzt wird. Im Falle von Vaccinen erlaubt dies das Planen der Antigen-Freigabe in einer solchen Weise, daß die Antikörper-Antwort im Anschluß an eine einzelne Verabreichung maximiert wird. Eines der möglichen Freigabe-Profile, von dem erwartet würde, daß es die
- 15 Antikörper-Antwort auf eine Vaccine verbessert, ist eine gepulste Freigabe (analog zu herkömmlichen Wiederauffrischungs-Immunisierungen bzw. Verstärkungs-Immunisierungen).

- Die Möglichkeit der Anwendung eines gepulsten Freigabe-Profiles wurde untersucht durch
- 20 subkutane Verabreichung von  $100 \mu\text{g}$  Enterotoxoid an Gruppen von Mäusen entweder in Mikrokapseln einer Größe von 1 bis  $10 \mu\text{m}$  (50:50 DL-PLG; 1,51 Gew.-% Enterotoxoid), Mikrokapseln mit einem Durchmesser von 20 bis  $125 \mu\text{m}$  (50:50 DL-PLG; 0,64 Gew.-% Enterotoxoid) oder in einer Mischung von Mikrokapseln mit einem Durchmesser von 1 bis  $10 \mu\text{m}$  und 20 bis  $125 \mu\text{m}$ , in denen gleiche Mengenteile des Enterotoxoids in Mikro-
- 25 kapseln jedes Größenbereichs enthalten waren. Den Mäusen der einzelnen Gruppen wurde Blut in Zeitintervallen von 10 Tagen abgenommen, und die Plasma-IgG-Antworten wurden bestimmt durch Endpunkt-Titration in Isotyp-spezifischen immunoradiometrischen Assays, in denen an fester Phase absorbiertes Enterotoxin verwendet wurde (Figur 1).
- 30 Im Anschluß an die Verabreichung der Enterotoxoid-Mikrokapseln mit einem Durchmesser von 1 bis  $10 \mu\text{m}$  wurde die Plasma-IgG-Antwort am Tag 10 bestimmt; sie stieg

auf einen Maximal-Titer von 102.400 an den Tagen 30 und 40 und fiel bis zum Tag 60 auf 25.600.

Im Gegensatz dazu war die Antwort auf das Toxoid, das in 20 bis 125  $\mu\text{m}$  großen Mikro-  
5 kapseln verabreicht worden war, bis zum Tag 30 verzögert und stieg danach auf einen Titer von 51.200 an den Tagen 50 und 60 an.

Die gleichzeitige Verabreichung gleicher Teile Toxoid in 1 bis 10  $\mu\text{m}$  großen und 20 bis 125  $\mu\text{m}$  großen Mikrokapseln führte zu einer IgG-Antwort, die für die ersten 30 Tage im  
10 wesentlichen dieselbe war, wie sie durch die 1 bis 10  $\mu\text{m}$  großen Mikrokapseln bei alleiniger Verabreichung hervorgerufen worden war. Jedoch stieg mit Beginn des Tages 40 die Antwort, die in den Mäusen gemessen wurde, die gleichzeitig Mikrokapseln einer Größe von 1 bis 10  $\mu\text{m}$  und einer Größe von 20 bis 125  $\mu\text{m}$  erhalten hatten, stetig bis auf einen Titer von 819.200 am Tag 60 an. Dieser Wert ist weit höher als die additive  
15 Antwort, die durch die einzeln verabreichten Mikrokapseln beider Größenbereiche induziert worden war.

Die Antikörper-Antwort, die durch die gemeinsame Verabreichung von ein Enterotoxoid enthaltenden Mikrokapseln einer Größe von 1 bis 10  $\mu\text{m}$  und einer Größe von 20 bis 125  
20  $\mu\text{m}$  erhalten worden war, ist in Übereinstimmung mit einer Zwei-Phasen-Abgabe (gepulsten Abgabe) des Antigens. Der erste Puls resultiert aus der schnellen Aufnahme und dem beschleunigten Abbau der 1 bis 10  $\mu\text{m}$  großen Teilchen durch Gewebe-Histiozyten. Dieser führt zu einer potenzierten Primär-Immun-Antwort aufgrund der effizienten Einladung hoher Konzentrationen des Antigens in diese akzessorischen Zellen und höchstwahrscheinlich auch deren Aktivierung. Die zweite Phase der Antigen-Abgabe erfolgt aufgrund  
25 des Bioabbaus der 20 bis 125  $\mu\text{m}$  großen Mikrokapseln, die zu groß sind, um von Phagocyten-Zellen aufgenommen zu werden. Dieser zweite Antigen-Puls wird an einen geprimten Wirt abgegeben und stimuliert eine anamnestiche Immun-Antwort. So kann unter Verwendung des 50:50 DL-PLG-Copolymers ein aus einer einzigen Injektion bestehendes  
30 Vaccine-Abgabesystem entwickelt werden, das Antikörper-Antworten potenziert (Mikrokapseln mit einem Durchmesser von 1 bis 10  $\mu\text{m}$ ) und das für eine zeitlich abgestimmte

und über lange Zeit andauernde Sekundär-Wiederauffrischungs-Immunisierung sorgt (Mikrokapseln mit einem Durchmesser von 20 bis 125  $\mu\text{m}$ ). Außerdem ist es durch Veränderung des Verhältnisses der Copolymere möglich, Formulierungen herzustellen, bei denen die Abgabe noch später erfolgt, um tertiäre oder sogar quartäre Wiederauffrischungen zu schaffen, ohne daß hierfür zusätzliche Injektionen erforderlich sind.

Daher gibt es eine Anzahl realisierbarer Möglichkeiten für eine Impfung mit den injizierbaren Mikrokapseln der vorliegenden Erfindung. Diese schließen Mehrfach-Injektionen kleiner Mikrokapseln, vorzugsweise mit einem Durchmesser von 1 bis 5  $\mu\text{m}$ , die von Makrophagen verschlungen werden und die Notwendigkeit der Verabreichung von Immunpotentioren entbehrlich machen, sowie Mischungen von freiem Antigen für eine Primär-Antwort in Kombination mit mikroverkapseltem Antigen in Form von Mikrokapseln, die einen Durchmesser von 10  $\mu\text{m}$  oder größer aufweisen und das Antigen pulsierend freisetzen und so Sekundär- und Tertiär-Antworten potenzieren und eine Immunisierung mit einer einzigen Verabreichung erreichen, ein. Es kann auch eine Kombination kleiner Mikrokapseln für eine Primär-Antwort und größerer Mikrokapseln für Sekundär- und spätere Antworten verwendet werden, wodurch die Notwendigkeit der Verabreichung sowohl von Immunpotentioren als auch von mehreren Injektionen überflüssig gemacht wird.

20

## **B. Oral verabreichte Vaccine-Mikrokapseln**

### **Beispiel 1**

**Oral verabreichte, TNP-KLH enthaltende Mikrokügelchen induzieren gleichzeitig zirkulierende und Schleimhaut-Antikörper-Antworten auf TNP**

25

Mikrokapseln, die das haptenierte Protein-Antigen Trinitrophenol-Keyhole Limpet-Hämocyanin (TNP-KLH) enthielten, wurden unter Verwendung von 50:50 DL-PLG als Träger hergestellt. Diese Mikrokapseln wurden nach der Größe getrennt, und die Mikrokapseln im Bereich eines Durchmessers von 1 bis 5  $\mu\text{m}$  wurden zur Bewertung ausgewählt. Diese Mikrokapseln enthielten 0,2 Gew.-% Antigen. Ihr Vermögen, nach Aufnahme als wirksa-

30



mes Antigen-Abgabesystem zu dienen, wurde getestet durch Verabreichen von 0,5 ml einer 10 mg/ml Suspension (10  $\mu$ g Antigen) in mit Bicarbonat gepuffertem sterilem Leitungswasser über Inkubation in den Magen an vier aufeinander folgenden Tagen. Zu Vergleichszwecken wurde eine weitere Gruppe von Mäusen parallel dazu oral immunisiert  
5 mit 0,5 ml einer 20  $\mu$ g/ml Lösung von nicht verkapseltem TNP-KLH. Kontrollmäusen wurde oral nur das Verdünnungsmittel verabreicht.

An den Tagen 14 und 28 im Anschluß an die letzte Immunisierung wurden von fünf Mäusen in jeder Gruppe, die nichts gefressen hatten, Serum, Speichel und Darmsekret  
10 abgenommen. Diese Proben wurden in Isotyp-spezifischen Radioimmuno-Assays untersucht und so die Konzentration an für TNP spezifischen und an Gesamt-Antikörpern der IgM-, IgG- und IgA-Isotypen bestimmt (Tabelle 13). Die Speichel-Proben und Darmsekret-Proben enthielten Antikörper, die fast ausschließlich der IgA-Klasse angehörten. Diese Ergebnisse sind in Übereinstimmung mit früheren Untersuchungen und liefern den  
15 Beweis, daß die Verfahrensweisen, die zur Gewinnung dieser Sekrete eingesetzt wurden, nicht zu einer Kontamination mit Serum führen. Keiner der für die Immunisierung eingesetzten Verabreichungspläne führte zu signifikanten Änderungen der Gesamtkonzentration an in einer der getesteten Flüssigkeiten vorhandenen Immunglobuline. Niedrige, jedoch nachweisbare Konzentrationen natürlich vorkommender Anti-TNP-Antikörper der  
20 Isotypen IgM und IgG wurden im Serum nachgewiesen und solche des IgA-Isotyps wurden im Serum und in Darmsekreten von scheinimmunisierten Kontrollmäusen nachgewiesen. Die Verabreichung von 30  $\mu$ g mikroverkapselten TNP-KLH in gleichen Dosen über drei aufeinanderfolgende Tage führte jedoch zum Auftreten von signifikanten Mengen Antigen-spezifischer IgA-Antikörper in den Sekreten und zum Auftreten aller  
25 Isotypen im Serum am Tag 14 nach der Immunisierung (siehe letzte Spalte von Tabelle 13). Diese Antikörper-Konzentrationen erhöhten sich weiter am Tag 28. Im Gegensatz dazu war die orale Verabreichung derselben Menge an unverkapseltem Antigen dahingehend unwirksam, spezifische Antikörper irgendeines Isotyps in irgendeiner der getesteten Flüssigkeiten zu induzieren.

Diese Ergebnisse sind in mehrererlei Hinsicht bemerkenswert. Zum einen wird die Bildung signifikanter Mengen Antigen-spezifischer IgA-Antikörper im Serum und in Schleimhautsekreten induziert. Dies ist eine Antwort, die im Anschluß an die allgemein angewendeten systemischen Immunisierungs-Verfahren schwach ist oder fehlt. Daher wird  
5 erwartet, daß dieses Immunisierungs-Verfahren zu einer signifikant erhöhten Immunität am Ort der Schleimhaut führt, die das Pathologie-Eintrittsportal oder die Eintrittsstelle für eine Anzahl bakterieller oder viraler Pathogene ist. Zum zweiten war die mikroverkapselte Antigen-Zubereitung ein wirksames Immunogen bei oraler Verabreichung, während dies für dieselbe Menge an nicht-verkapseltem Antigen nicht zutraf. So führte die Mikrover-  
10 kapselung zu einem dramatischen Anstieg der Wirksamkeit aufgrund der zielgerechten Ausrichtung auf die Peyer-Plaques und die erhöhte Aufnahme durch diese. Zum dritten scheint die induktive Phase der Immun-Antwort von langer Dauer zu sein. Während eine systemische Immunisierung mit Protein-Antigenen in Abwesenheit von Zusatzstoffen durch einen Peakwert der Antikörper-Konzentrationen in 7 bis 14 Tagen charakterisiert  
15 ist, waren die durch oral verabreichte, Antigen enthaltende Mikrokapseln induzierten Antworten am Tag 28 höher als am Tag 14. Dies zeigt, daß eine Bioerosion der Wandungsmaterialien und eine Freisetzung des Antigens über einen längeren Zeitraum stattfindet und so eine Antwort von längerer Dauer induziert.

20

### Beispiel 2

#### **Oral verabreichte, SEB-Toxoid enthaltende Mikrokapseln induzieren gleichzeitig zirkulierende und Schleimhaut-Anti-SEB-Toxin-Antikörper**

Die oben vorgestellten Ergebnisse, die zeigen, daß (a) eine starke Hilfsmittel-Aktivität  
25 durch eine Mikroverkapselung verliehen wird und (b) Mikrokapseln mit einem Durchmesser  $< 5 \mu\text{m}$  sich in die mesenterischen Lymphknoten und die Milz nach Eintritt über die Peyer-Plaques ausbreiten, legen nahe, daß es möglich wäre, eine systemische Immun-Antwort durch orale Immunisierung mit einer Vaccine zu induzieren, die in biologisch abbaubaren Mikrokapseln geeigneter Größe eingearbeitet ist. Diese Möglichkeit wurde in  
30 Experimenten bestätigt, in denen Gruppen von Mäusen mit  $100 \mu\text{g}$  Staphylococcal-Enterotoxoid B in löslicher Form oder in Mikrokapseln mit einem 50:50 DL-PLG-Träger

immunisiert wurden. Diesen Mäusen wurde das lösliche Toxoid oder das mikroverkapselte Toxoid über ein Darmrohr bei drei durch 30 Tage voneinander getrennten Gelegenheiten verabreicht, und es wurden Plasmaproben an den Tagen 10 und 20 nach jeder Immunisierung entnommen. Die in Tabelle 14 vorgestellten Daten zeigen die Plasma-Endpunkt-Titer der IgM- und IgG-Antitoxin-Antworten für den Zeitpunkt des Tages 20 nach der primären, sekundären und tertiären oralen Immunisierung.

Mäuse, die die in Mikrokapseln eingearbeitete Vaccine erhalten hatten, zeigten einen stetigen Anstieg der im Plasma vorhandenen Antikörper, die für das Toxin spezifisch sind, mit jeder Immunisierung, während des lösliche Enterotoxoid unwirksam war. In diesem Experiment wurde dieselbe Charge Mikrokapseln verwendet, und das Experiment wurde durchgeführt und parallel mit den in den obigen Tabellen 4, 5 und 6 präsentierten Ergebnissen getestet. Daher zeigen diese Daten direkt, daß eine orale Immunisierung mit mikroverkapseltem Staphylococcen-Enterotoxoid B wirksamer darin ist, eine Antitoxin-Antwort im Serum zu induzieren, als dies die parenterale Injektion des löslichen Enterotoxoids bei seiner optimalen Dosis ist.

Die Sekret IgA-Antwort wurde in derselben Gruppe von Mäusen untersucht. Es wurde erörtert, daß die charakteristischen Eigenschaften dieser Charge Enterotoxoid-haltiger Mikrokapseln, ein heterogener Größenbereich von  $< 1 \mu\text{m}$  bis etwa  $10 \mu\text{m}$ , es wahrscheinlich machte, daß ein Teil der Mikrokapseln das Toxoid freisetzte, während sie an den Peyer-Plaques befestigt waren. Daher wurden an den Tagen 10 und 20 im Anschluß an die tertiäre orale Immunisierung Proben von Speichel und Darmauswaschung abgenommen und auf Toxin-spezifische Antikörper des IgA-Isotyps getestet (Tabelle 15). Im Gegensatz zum Unvermögen des löslichen Toxoids, eine Antwort hervorzurufen, wenn es oral verabreicht wird, führte die Aufnahme einer gleichen Menge der Toxoid-Vaccine, die in Mikrokapseln eingearbeitet war, zu einer deutlichen sIgA-Antitoxoid-Antwort sowohl im Speichel als auch in den Darmsekreten. Es sollte ausgeführt werden, daß die Darmsekrete von jeder Maus auf ein Gesamtvolumen von 5 ml während der Abnahme verdünnt wurden. Obwohl es schwierig ist, den exakten Verdünnungsfaktor zu bestimmen, den dies dem gewonnen Material auferlegt, ist es sicher anzunehmen, daß die sIgA-Konzentration

mindestens um den Faktor 10 höher in der Schleimhaut ist, mit der der Darm in Kontakt steht. Dies wurde jedoch für die hier vorgestellten Messungen nicht in Betracht gezogen.

Diese Daten demonstrieren klar die Wirksamkeit des mikroverkapselten Enterotoxoids bei  
5 der Induzierung einer sIgA-Antitoxin-Antwort sowohl im Darm als auch an einer davon  
entfernten Schleimhaut-Stelle, wenn das Enterotoxoid oral verabreicht wird. Außerdem ist  
durch den Gebrauch einer Mischung von Mikrokapseln mit einem Bereich der Durch-  
messer von  $< 1$  bis  $10\ \mu\text{m}$  möglich, diese Schleimhaut-Antwort gleichzeitig mit einer  
starken zirkulierenden Antikörper-Antwort zu induzieren. Dies legt nahe, daß eine  
10 Vielzahl von Vaccinen durch die Verwendung der Mikroverkapselungs-Technologie  
sowohl wirksamer als auch leichter zu verabreichen gemacht werden kann.

### C. Intratracheal verabreichte Vaccine-Mikrokapseln

15

#### Beispiel 1

#### **Intratracheal verabreichte, SEB-Toxoid enthaltende Mikrokapseln induzieren gleichzeitig zirkulierende und Schleimhaut-Antitoxin-Antikörper**

Folliculi lymphatici aggregati, die den Peyer-Plaques des Gastrointestinaltraktes ähnlich  
20 sind, sind in den Schleimhaut-verbundenen Lymphoid-Geweben zugegen, die in anderen  
Stellen im Körper gefunden werden, beispielsweise im Atemtrakt. Ihre Funktion ist  
insofern ähnlich der der Peyer-Plaques, als sie Material aus dem Lumen der Lungen  
absorbieren und Induktionsstelle für Antikörper-Antworten sind, die durch einen hohen  
Anteil sIgA charakterisiert sind. Die Möglichkeit einer Immunisierung durch das mit den  
25 Bronchen verbundene Lymphoid-Gewebe wurde untersucht. Gruppen von Mäusen wurden  
 $50\ \mu\text{l}$  PBS (mit Phosphat gepufferter Kochsalz-Lösung) verabreicht, die  $50\ \mu\text{g}$  SEB-  
Toxoid entweder in verkapselter oder in nicht-verkapselter Form enthält. Die Verabrei-  
chung erfolgte direkt in die Trachea (Lufttröhre). An den Tagen 10, 20, 30 und 40 im  
Anschluß an die Immunisierung wurden Proben von Plasma, Speichel, Darmauswaschun-  
30 gen und Bronchialalveolen-Auswaschungen gewonnen.

Ein Assay der Plasmaproben auf Antitoxin-spezifische Antikörper ergab, daß die Verabreichung von freiem SEB-Toxoid nicht zu einer Induzierung einer nachweisbaren Antikörper-Antwort bei irgendeinem Isotyp führte (Tabelle 16). Im Gegensatz dazu erbrachte die intratracheale Instillation einer gleichen Dosis verkapselter SEB-Vaccine Toxin-spezifische Antikörper aller Isotypen. Diese Antwort erreichte einen Maximalwert am Tag 30 und blieb bis über den Tag 40 hinaus mit Titern für IgM, IgG und IgA von 400, 51.300 bzw. 400 erhalten.

Ähnlich zu den Antworten, die im Plasma beobachtet worden waren, wurden Toxin-spezifische Antikörper in den Bronchialalveolen-Auswaschungen induziert durch das mikroverkapselte Toxoid, nicht jedoch durch die nicht-verkapselte Vaccine (Tabelle 17). Die Kinetik des Erscheinens der Antitoxin-Antikörper in den Bronchialsekreten war etwas verzögert, verglichen mit der Antwort im Plasma, und zwar dahingehend, daß die Antwort am Tag 20 nur in dem IgG-Isotyp nachgewiesen wurde und niedrig war im Vergleich zu den Plateau-Konzentrationen, die schließlich erhalten wurden. Jedoch wurden Maximal-Titerwerte für IgG- und IgA-Antitoxin-Antikörper (1.280 bzw. 320) am Tag 30 erhalten und blieben bis zum Tag 40 erhalten. Es wurden in den Bronchialalveolen-Auswaschungen bei Verwendung dieses Immunisierungs-Verfahrens keine Antikörper der IgM-Klasse nachgewiesen. Dieses Ergebnis ist in Übereinstimmung mit der Abwesenheit von IgM abscheidenden Plasmazellen in den Lungen und dem Unvermögen dieses großen Antikörpermoleküls, aus dem Serum die bei einem Molekulargewicht von etwa 200.000 anzusetzende "Absperrung" zu durchtreten, die von der Kapillar-Alveolen-Membran gesetzt wird.

Diese Ergebnisse zeigen, daß eine Mikroverkapselung möglich machte, daß eine Immunantwort gegenüber dem Antigen-SEB-Toxoid im Anschluß an dessen Verabreichung in den Atemtrakt erfolgte, während nicht-verkapseltes Antigen unwirksam war. Diese Antwort wurde sowohl im Kreislauf als auch bei den Sekreten beobachtet, mit denen der Atemtrakt in Kontakt steht. Es sollte angemerkt werden, daß dieses Immunisierungs-Verfahren wirksam war, das Auftreten von Antikörpern der Klasse IgA zu induzieren. Dieser Antikörper ist vermutlich das Produkt einer lokalen Synthese im oberen Atemtrakt, einem Bereich, der nicht durch die Antikörper der Klasse IgG geschützt ist, die in die unteren

Lungen aus dem Kreislauf eintreten. So ist die intratracheale Immunisierung mit mikroverkapselten Antigenen durch die Inhalation von Aerosolen ein wirksames Mittel zur Induzierung von Antikörpern, die den oberen Atemtrakt schützen.

## 5      **D. Über gemischte Immunisierungs-Wege verabreichte Vaccine-Mikrokapseln**

Es wurde sowohl im Menschen als auch in Tieren gezeigt, daß eine systemische Immunisierung, gekoppelt mit einer Schleimhautpräsentation eines Antigens, wirksamer ist als jede andere Kombination zur Förderung von Immun-Antworten auf Schleimhäuten ("N.F. Pierce und J.L. Gowans; Cellular kinetics of the intestinal immune response to cholera toxoid in rats; J. Exp. Med. 142 (1975), 1550"). Drei Gruppen von Mäusen wurden durch IP-Immunisierung mit 100 µg mikroverkapselten SEB-Toxoids geprimt. 30 Tage später wurden sie mit 100 µg mikroverkapselten SEB-Toxoids entweder auf dem IP-Weg, auf dem oralen Weg oder auf dem IT-Weg geimpft. Dies erfolgte, um direkt zu bestimmen, ob ein gemischter Immunisierungs-Plan unter Einsatz von mikroverkapseltem Antigen vorteilhaft in Bezug auf induzierten sIgA-Konzentrationen war.

20 Tage nach den Auffrischungs-Immunisierungen mit mikroverkapseltem Material wurden Proben von Plasma, Darmauswaschungen und Bronchialalveolen-Auswaschungen abgenommen, und es wurden die Konzentrationen und Isotyp-Verteilungen der Anti-SEB-Toxin-Antikörper in Endpunkt-Titrations-Radioimmuno-Assays bestimmt (Tabelle 18). Die IP-Auffrischung von mit IP geprimten Mäusen führte zum Auftreten hoher Konzentrationen von IgG-Antitoxin-Antikörpern in den Proben des Plasmas und der Sekrete. Sie war jedoch vollständig unwirksam zur Induktion nachweisbarer Konzentrationen von IgA-Antikörpern in irgendeiner der getesteten Flüssigkeiten.

Im Gegensatz dazu steigerte eine Sekundär-Immunisierung mit mikroverkapseltem SEB-Toxoid entweder auf oralem oder auf dem IT-Weg wirksam die Konzentrationen spezifischer IgG-Antikörper im Plasma (der Titer vor der Sekundär-Immunisierung in jeder Gruppe war 51.200) und induzierte auch das Auftreten signifikanter Konzentrationen von sIgA-Antikörpern in den Darmauswaschungen und den Bronchialalveolen-Auswaschungen.

- Eine orale Wiederauffrischung von über IP geprimten Mäusen induzierte die Sekretion von sIgA-Anti-SEB-Toxin-Antikörpern in die Darmsekrete in Konzentrationen, die vergleichbar mit denen waren, die drei im Abstand voneinander verabreichte orale Immunisierungen erforderten (Tabelle 18 im Vergleich zu Tabelle 15). Eine intratracheale
- 5 Wiederauffrischung von vorher über IP immunisierten Mäusen war insbesondere wirksam für die Induzierung einer verstreuten Schleimhaut-Antwort und ergab das Auftreten hoher gleichzeitiger Konzentrationen von IgG und sIgA-Antikörpern sowohl in Proben der Bronchialalveolen-Sekrete als auch der Darmsekrete.
- 10 Diese Ergebnisse sind besonders wichtig in Bezug auf eine Immunisierung gegen zahlreiche infektiöse Agentien, die ihre pathophysiologischen Wirkungen über akute Infektionen ausüben, die im Atemtrakt lokalisiert sind. Innerhalb des Atemtraktes vorhandene Antikörper stammen aus zwei verschiedenen Quellen. Sekret-IgA dominiert im Mucus (Schleim), der mit dem Nasen-Rachen-Raum und dem Bronchial-Baum in Kontakt steht ("C.A.
- 15 Soutar; Distribution of plasma cells and other cells containing immunoglobulin in the respiratory tract of normal man and class of immunoglobulin contained therein; Thorax 31 (1976), 58"; und "H.B. Kaltreider und M.K.L. Chan; The class-specified immunoglobulin composition of fluids obtained from various levels of canine respiratory tract; J. Immunol. 116 (1976), 423") und ist das Produkt lokaler Plasmazellen, die in den Lamina
- 20 propria des oberen Atemtraktes angeordnet sind. Im Gegensatz zum Nasen-Rachen-Raum und zum Bronchial-Baum enthalten die Bronchiolen und Alveolen vornehmlich IgG, das passiv aus dem Blutkreislauf über Absonderung stammt ("H.Y. Reynolds und H.H. Newball; Analysis of proteins and respiratory cells obtained from human lungs by bronchial lavage; J. Lab. Clin. Med. 84 (1974), 559"). So erfordert ein wirksamer Schutz der
- 25 Lunge sowohl zirkulierende IgG- als auch Schleimhaut-gebundene sIgA-Antikörper.

- Diese Ergebnisse zeigen, daß Pläne einer Immunisierung auf gemischtem Wege, die von mikroverkapselten Antigenen Gebrauch machen, sich als höchst wirksam bei der Induzierung gleichzeitiger Kreislauf- und Schleimhaut-Antikörper-Antworten herausgestellt haben.
- 30 Obwohl die Experimente, über die hier berichtet wird, diskrete Priming- und Wiederauffrischungs-Schritte untersuchen, von denen jeder eine Verabreichung von mikroverkapsel-

tem Antigen erforderte, ist es möglich, von der Flexibilität bei der gesteuerten pulsartigen Freisetzung Gebrauch zu machen, die durch ein Mikrokapsel-Abgabesystem geschaffen wird, um so einen Zeitplan mit einer einzigen Verabreichungszeit vorzusehen, was gleichzeitig eine maximale systemische und sekretorische Immunität stimuliert. Als  
5 Beispiel könnte mikroverkapseltes Antigen sowohl durch Injektion als auch orale Aufnahme während eines einzelnen Besuches bei einem Arzt verabreicht werden. Durch Variation des Verhältnisses Lactid zu Glycolid in den beiden Dosismengen könnte die systemisch verabreichte Dosis innerhalb weniger Tage abgegeben werden, um das Immunsystem zu primen, und die zweite (orale) Dosis könnte in den Peyer-Plaques zur späteren  
10 Zeit freigesetzt werden, um eine wiederaufgefrischte bzw. verstärkte Schleimhaut-Antwort zu stimulieren.

#### IV. Absorption von pharmazeutischen Substanzen

15 Das folgende Beispiel zeigt, daß kleine Mikrokapseln (weniger als 5  $\mu\text{m}$ , vorzugsweise 1 bis 5  $\mu\text{m}$ ) auch die Absorption von pharmazeutischen Substanzen sowie von Antigenen im Körper verbessern können. Etretnat[(All-E)-9-(4-Methoxy-2,3,6-trimethyl-)phenyl-3,7-dimethyl-2,4,8-nonatetraensäureethylester] wurde in 50:50 Poly-(DL-lactid-co-glycolid) mikroverkapselt. Die Mikrokapseln hatten einen Durchmesser von 0,5 bis 4  $\mu\text{m}$  und  
20 enthielten 37,2 Gew.-% Etretnat. Diese Etretnat-Mikrokapseln sowie nicht-verkapseltes Etretnat wurden Mäusen mittels oral geführter Sondenernährung unter Verwendung von 1 Gew.-% Tween<sup>80</sup> in Wasser als Träger verabreicht. Es wurden nur Einzeldosen von 50 mg Etretnat/kg abgegeben.

25 Blut von den mit dieser Dosis gefütterten Mäusen wurde in spezifischen Zeitintervallen gesammelt, und das Serum dieses Bluts wurde mengenmäßig auf Etretnat und/oder seine Metaboliten unter Einsatz eines Hochleistungs-Chromatographie-Verfahrens untersucht (Tabelle 19). Die Ergebnisse zeigen, daß Mäuse, die mit den Etretnat-Mikrokapseln behandelt worden waren, im Blut signifikant höhere Konzentrationen an Etretnat hatten  
30 als Mäuse, die mit nicht-verkapseltem Etretnat behandelt worden waren. Wie bei den einen geringeren Durchmesser als 5  $\mu\text{m}$  aufweisenden Vaccine-Mikrokapseln wird an-



genommen, daß die Mikrokapseln das Etreinat in den Blutstrom über das Lymphoidgewebe (Peyer-Plaques) im Gastrointestinal-Trakt transportieren. Dieselbe Überlegung sollte anwendbar sein auf eine Erhöhung der Absorption anderer Arzneimittel, wobei diese Anwendung besonders nützlich wäre für die Abgabe biologischer, pharmazeutischer Stoffe  
5 wie beispielsweise die Abgabe von Peptiden, Proteinen, Nucleinsäuren und dergleichen.

Es folgen die Tabellen 1 bis 19.

Tabelle 1

**Penetration von Cumarin-6 enthaltenden 85:15-DL-PLG-Mikrokügelchen in und  
durch die Peyer-Plaques im Anschluß an eine orale Verabreichung**

Zeit (Tage)	beobachtete Gesamtzahl	Anteil des Durchmessers (%)			Anteil an einer bestimmten Stelle (%)	
		klein < 2 $\mu\text{m}$	mittel 2 - 5 $\mu\text{m}$	groß > 5 $\mu\text{m}$	außen	innen
1	296	47	35	18	92	8
2	325	45	32	23	83	17
4	352	46	31	23	76	24
7	196	21	29	41	88	11
14	148	16	29	55	98	2
21	91	7	27	66	98	2
28	63	5	24	71	100	0
35	52	6	19	79	97	3

Tabelle 2

Wanderung von Cumarin-6 enthaltenden 85:15-DL-PLG-Mikrokügelchen in und durch die mesenterischen Lymphknoten im Anschluß an eine orale Verabreichung

5

Zeit (Tage)	beobachtete Gesamtzahl	Anteil des Durchmessers (%)			Anteil an einer bestimmten Stelle (%)	
		klein < 2 $\mu\text{m}$	mittel 2 - 5 $\mu\text{m}$	groß > 5 $\mu\text{m}$	außen	innen
1	8	50	50	0	100	0
2	83	76	24	0	95	5
4	97	73	27	0	73	27
7	120	67	32	0	64	36
14	54	83	17	0	9	91
21	20	75	25	0	5	95
28	15	67	32	0	0	100
35	9	44	56	0	0	100

10

15

Tabelle 3

Gezielte Absorption von 1  $\mu\text{m}$  bis 10  $\mu\text{m}$ -Mikrokügelchen mit verschiedenen Trägern durch die Peyer-Plaques  
der Darm-gebundenen Lymphoid-Gewebe im Anschluß an eine orale Verabreichung

5

Mikrokügelchen-Träger	Biologisch abbaubar	Absorption durch die Peyer-Plaques
Poly-(styrol)	Nein	sehr gut
Poly-(methylnmethacrylat)	Nein	sehr gut
Poly-(hydroxybutyrat)	Ja	sehr gut
Poly-(DL-lactid)	Ja	gut
Poly-(L-lactid)	Ja	gut
85:15 Poly-(DL-lactid-co-glycolid)	Ja	gut
50:50 Poly-(DL-Lactid-co-glycolid)	Ja	gut
Celluloseacetathydrogenphthalat	Nein	keine
Cellulosetriacetat	Nein	keine
Ethylcellulose	Nein	keine

10

15

Tabelle 4

**Primär-Antitoxin-Antwort auf mikroverkapseltes Staphylococcal-Enterotoxin B gegen lösliches Staphylococcal-Enterotoxin B**

5	Toxoid-Dosis (μg)		Form	Plasma-Antitoxin-Titer			
	Tag 20			Tag 10			
	IgM	IgG				IgM	IgG
10	100	mikroverkapselt mikroverkapselt mikroverkapselt löslich löslich löslich	1.280	320	1.280	10.240	
	50		640	320	1.280	5.120	
	25		320	< 20	640	2.560	
	50		< 20	< 20	< 20	< 20	
	25		320	< 20	160	< 20	
	12,5		40	< 20	< 20	< 20	

Tabelle 5

Sekundär-Antitoxin-Antwort auf mikroverkapseltes Staphylococcen-Enterotoxoid B gegen lösliches Staphylococcen-Enterotoxoid B

Toxoid-Dosis ( $\mu$ g) pro Immunisierung	Form	Plasma-Antitoxin-Titer			
		Tag 10		Tag 20	
		IgM	IgG	IgM	IgG
100	mikroverkapselt mikroverkapselt mikroverkapselt löslich löslich löslich	320	163.840	160	81.920
50		640	81.920	640	163.840
25		2.560	40.960	640	81.920
50		160	< 20	80	< 20
25		320	160	160	320
12,5		160	40	40	80

5

10

Tabelle 6

**Tertiär-Antitoxin-Antwort auf mikroverkapseltes Staphylococcen-Enterotoxoid B gegen lösliches Staphylococcen-Enterotoxoid B**

Toxoid-Dosis ( $\mu\text{g}$ ) pro Immunisierung	Form	Plasma-Antitoxin-Titer			
		Tag 10		Tag 20	
		IgM	IgG	IgM	IgG
100	mikroverkapselt mikroverkapselt mikroverkapselt löslich löslich löslich	1.280	655.360	640	327.680
50		2.560	327.680	280	327.680
25		2.560	327.680	640	163.840
50		640	1.280	640	640
25		320	10.240	80	10.240
12,5		160	1.280	40	1.280

5

10

Tabelle 7

**Primäre systemische Antitoxin-Antwort, induziert durch verschiedene parenterale Immunisierungs-Wege**

Dosis ( $\mu\text{g}$ ) mikroverkapseltes Toxoid	Immunisierungs-Weg	Plasma-IgG-Antitoxin-Titer			
		Tag 15		Tag 45	
		IgM	IgG	IgM	IgG
100	intraperitoneal subkutan	12.800	102.400	204.800	204.800
100		6.400	25.600	204.800	204.800

15

**Tabelle 8**

**Sekundäre systemische Antitoxin-Antwort, induziert durch verschiedene parenterale Immunisierungs-Wege**

Dosis ( $\mu\text{g}$ ) mikroverkapseltes Toxoid pro Immunisierung	Immunisierungs-Wege	Plasma-IgG-Antitoxin-Titer		
		Tag 15	Tag 30	Tag 45
100	IP - IP SC - SC	819.200	1.638.400	3.276.800
100		409.600	819.200	3.276.800



Tabelle 9

Mikrokügelchen besitzen keine inhärente Hilfsmittel-Aktivität

Dosis ( $\mu\text{g}$ ) Toxoid	Form	Plasma-Antitoxin-Titer					
		Tag 10		Tag 20		Tag 30	
		IgM	IgG	IgM	IgG	IgM	IgG
25	Antigen in Mikrokügelchen	6.400	6.400	400	12.800	800	25.600
25	Lösliches Antigen	800	< 50	200	800	100	< 50
25	Antigen plus Placebo-Mikrokügelchen	800	< 50	200	< 50	200	50

Tabelle 10

Systemische Antitoxin-Antwort, induziert durch parenterale Immunisierung  
( $\mu$ m-Mikrokügelchen, die Antigen mit verschiedenen Geschwindigkeiten versetzen)

5

Dosis ( $\mu$ g) Toxoid	Form	Verhältnis Lactid/ Glycolid	Antigen- abgabe bei 48 h	Plasma-IgG-Antitoxin-Titer am Tag					
				10	15	20	30	45	60
100	löslich Mikrokügelchen Mikrokügelchen Mikrokügelchen Mikrokügelchen	---	---	< 50	< 50	< 50	< 50	< 50	< 50
100		50 : 50	60 %	400	---	6.400	3.200	---	---
100		50 : 50	30 %	400	---	12.800	6.400	---	---
100		50 : 50	10 %	---	6.400	---	102.400	102.400	51.200
100		85 : 15	0 %	---	3.200	---	51.200	102.400	102.400

10

15

Tabelle 11

**Ergebnisse der CPE-Inhibitions-Assays an Serumproben  
aus den JE-Vaccine-Immunisierungs-Studien**

5

10

15

20

25

Tier	Verdünnung des Serums mit der Fähigkeit zur Reduzierung einer Virus-induzierten CPE um 50 % am Tag		
	21	49	77
Gruppe 1 = unbehandelte Kontrolltiere			
GMT *	< 10	11	11
Durchschnitt	< 10	11	11
Maximum	< 10	16	< 20
Minimum	< 10	< 10	< 10
Gruppe 2 = 3,0 mg unverkapselte JE-Vaccine IP am Tag 10			
GMT	44	73	50
Durchschnitt	55	95	71
Maximum	127	254	160
Minimum	160	13	< 10
Gruppe 3 = 3,0 mg unverkapselte JE-Vaccine IP an den Tagen 0, 14 und 42			
GMT	507	3.880	1.576
Durchschnitt	934	5.363	2.951
Maximum	4.064	> 10.240	> 10.240
Minimum	< 10	806	254
Gruppe 4 = 3,0 mg unverkapselte und 3,0 mg mikroverkapselte JE-Vaccine IP am Tag 0			
GMT	77	718	1.341
Durchschnitt	803	1.230	2.468
Maximum	320	5.120	10.240
Minimum	13	160	254

Anmerkung: \* GMT = geometrischer mittlerer Titer

30

Tabelle 12

**Ergebnisse der Plaque-Reduktions-Assays an gepoolten Serumproben  
aus den JE-Vaccine-Immunisierungs-Studien**

5	Gruppe	Behandlung	Tag	Serumverdünnung zum Erreichen eines 50 %-Endpunkts und 80 %-Endpunkts	
				50 %	80 %
10	1 <sup>a</sup>	Kontrolle	0	< 10	< 10
	1	Kontrolle	14	< 10	< 10
	1	Kontrolle	21	< 10	< 10
	1	Kontrolle	42	< 10	< 10
	1	Kontrolle	49	< 10	< 10
	1	Kontrolle	84	< 10	< 10
15	2 <sup>b</sup>	unverkapselte JE	0	< 10	< 10
	2	unverkapselte JE	14	160	20
	2	unverkapselte JE	21	ND <sup>c</sup>	ND
	2	unverkapselte JE	42	320	80
	2	unverkapselte JE	49	320	40
	2	unverkapselte JE	84	640	160
20	3 <sup>d</sup>	unverkapselte JE	0	< 10	< 10
	3	unverkapselte JE	14	160	40
	3	unverkapselte JE	21	2.560	640
	3	unverkapselte JE	42	1.280	640
	3	unverkapselte JE	49	5.120	2.560
	3	unverkapselte JE	84	2.560	1.280
25	4 <sup>e</sup>	mikroverkapselte JE	0	< 10	< 10
	4	mikroverkapselte JE	14	160	20
	4	mikroverkapselte JE	21	320	80
	4	mikroverkapselte JE	42	5.120	640
	4	mikroverkapselte JE	49	5.120	640
	4	mikroverkapselte JE	84	10.000	2.560

Anmerkungen:

- a: Unbehandelte Kontrollproben
- b: Die Tiere erhielten 3,0 mg unverkapselte JE-Vaccine IP am Tag 0
- c: ND = nicht bestimmt (unzureichende Probenqualität)
- 35 d: Die Tiere erhielten 3,0 mg unverkapselte JE-Vaccine IP am Tag 0, 14 und 42
- e: Die Tiere erhielten 3,0 mg unverkapselte und 3,0 mg mikroverkapselte JE-Vaccine IP am Tag 0

Tabelle 13

Induzierung der Bildung von TNP-spezifischen Antikörpern in Serum/Schleimhaut-Sekreten  
von BALB/C-Mäusen bei oraler Immunisierung mit mikroverkapseltem TNP-KLH

Immunogen	Zeit nach der Immu- nisierung	Biologische Probe	ng Immunglobulin/ml Probe					
			IgM		IgG		IgA	
			Gesamt	Anti-TNP	Gesamt	Anti-TNP	Gesamt	Anti-TNP
Kontrolle	14 Tage	Darmanuswaschung Speichel Serum	<1 <40 445,121	<1 <10 6	62 <40 5,503,726	<1 <10 37	79,355 2,651 1,470,553	25 <10 32
Unver- kapseltes TNP-KLH	14 Tage	Darmanuswaschung Speichel Serum	4 <40 298,733	1 <10 11	131 <40 6,000,203	<1 <10 29	64,985 1,354 1,321,986	17 <10 21
Mikrover- kapseltes TNP-KLH	14 Tage	Darmanuswaschung Speichel Serum	3 <40 360,987	<1 <10 1,461	130 <40 5,312,896	<1 <10 572	95,368 1,461 1,411,312	222 88 1,077
Unver- kapseltes TNP-KLH	28 Tage	Darmanuswaschung Speichel Serum	<1 <40 301,223	<1 <10 21	94 <40 5,788,813	<1 <10 67	88,661 1,278 1,375,322	64 <10 63
Mikrover- kapseltes TNP-KLH	28 Tage	Darmanuswaschung Speichel Serum	4 <40 320,192	<1 <10 1,904	122 <40 5,951,503	2 <10 2,219	82,869 1,628 1,277,505	422 130 1,198

5

10

15

Tabelle 14

**IgM- und IgG-Antitoxin-Konzentrationen im Plasma am Tag 20 im Anschluß an eine primäre, sekundäre und tertiäre orale Immunisierung mit löslichem oder mikroverkapseltem (50:50 DL-PLG)-Staphylococcen-Toxoid**

5

10

Enterotoxoid-Dosis ( $\mu\text{g}$ ) pro Immunisierung	Form	Plasma-Antitoxin-Titer am Tag 20 im Anschluß an eine orale Immunisierung					
		primär		sekundär		tertiär	
		IgM	IgG	IgM	IgG	IgM	IgG
100	Mikro-kügelchen	80	1.280	320	5.120	1.280	40.960
100	löslich	< 20	< 20	80	< 20	640	< 20

15

Tabelle 15

**Toxin-spezifische IgA-Antikörper im Speichel und in Darmflüssigkeiten von Mäusen an den Tagen 10 und 20 nach einer tertiären oralen Immunisierung mit löslichem oder mikroverkapseltem Enterotoxoid**

20

25

Enterotoxoid-Dosis ( $\mu\text{g}$ ) pro Immunisierung	Form	IgA-Enterotoxoid-Titer im Anschluß an eine tertiäre orale Immunisierung			
		Tag 10		Tag 20	
		Speichel	Darmauswaschung	Speichel	Darmauswaschung
100	Mikro-kügelchen	1.280	1.024	640	256
100	lösliche Mikro-kügelchen	40	< 8	10	< 8

Tabelle 16

Antitoxin-Antikörper-Konzentration im Serum, induziert durch intratracheale Immunisierung mit löslichem oder mikroverkapseltem Staphylococcen-Enterotoxin B-Toxoid

Enterotoxoid-Dosis (µg)	Form	Plasma-Antitoxin-Titer am Tag nach der intratrachealen Immunisierung											
		10			20			30			40		
		IgM	IgG	IgA	IgM	IgG	IgA	IgM	IgG	IgA	IgM	IgG	IgA
50	Mikrover-kapselt	< 50	< 50	< 50	200	25.600	400	400	51.200	400	400	51.200	400
50	löslich	< 50	< 50	< 50	< 50	< 50	< 50	< 50	< 50	< 50	< 50	< 50	< 50

Tabelle 17

**Antikörper-Konzentrationen in Bronchial-Alveolen-Auswaschungen, induziert durch intratracheale Immunisierung mit löslichem oder mikroverkapseltem Staphylococcen-Enterotoxin B-Toxoid**

Enterotoxoid-Dosis (µg)	Form	Antitoxin-Titer in Bronchial-Alveolen-Auswaschungen am Tag nach der intratrachealen Immunisierung											
		10			20			30			40		
		IgM	IgG	IgA	IgM	IgG	IgA	IgM	IgG	IgA	IgM	IgG	IgA
50	Mikrover-kapselt	< 5	< 5	< 5	< 5	80	< 5	< 5	1.280	320	< 5	1.280	320
50	löslich	< 5	< 5	< 5	< 5	< 5	< 5	< 5	< 5	< 5	< 5	20	50



Tabelle 18

Anti-SEB-Toxin-Antikörper-Antworten, induziert in verschiedenen biologischen Fluids nach Immunisierungs-Protokollen auf verschiedenen Wegen unter Verwendung von mikroverkapseltem SEB-Toxoid

5

Immunisierungs-Weg		Dosis an mikrover- kapseltem SEB-Toxoid pro Immuni- sierung (µg)	Antitoxin-Titer am Tag 20 nach der Sekundär-Immunisierung									
			Plasma			Darmauswaschung			Brochialauswaschung			
			IgM	IgG	IgA	IgM	IgG	IgA	IgM	IgG	IgA	
Primär	Sekundär											
IP	IP	100	3.200	1.638.400	< 50	< 20	10.240	< 20	< 5	10.240	< 5	< 5
IP	oral	100	1.600	204.800	< 50	< 20	640	640	< 5	2.560	1.280	1.280
IP	IT	100	1.600	819.200	< 50	< 20	2.560	2.560	< 5	20.480	2.560	2.560

10

Tabelle 19

**Konzentration an Etretnat in Mäuseserum nach oraler Dosierung  
von mikroverkapseltem und unverkapseltem Etretnat**

5

10

Zeit (h)	Etretnat-Konzentration (ng/ml)	
	Mikrokapseln	Unverkapseltes Mittel
1	4,569	191
3	634	158
6	242	<31
24	ND	ND

Anmerkung: ND = nicht bestimmt

15

Europäische Patentanmeldung Nr. 89 302 746.6

The UAB Research Foundation et al.

### **P a t e n t a n s p r ü c h e**

(für die Vertragsstaaten DE, GB, FR, IT, NL, SE, CH, LI, BE, AT, LU)

1. Zubereitung zur Abgabe eines bioaktiven Mittels an das mit der Schleimhaut verbundene lymphoretikulare Gewebe eines Menschen oder eines anderen Tieres, umfassend:

- biokompatible Mikrokapseln, die ein bioaktives Mittel umfassen, das in einem biokompatiblen Träger eingekapselt ist, und die eine Größe von 1  $\mu\text{m}$  bis weniger als 5  $\mu\text{m}$  aufweisen, zur selektiven Absorption durch und zum Durchgang durch mit der Schleimhaut verbundenes lymphoretikulares Gewebe zur Schaffung von systemischer Immunität; und
- biokompatible Mikrokapseln, die das bioaktive Mittel umfassen, das in einem biokompatiblen Träger eingekapselt ist, und die eine Größe zwischen 5  $\mu\text{m}$  und 10  $\mu\text{m}$  aufweisen, zur selektiven Absorption und Retention durch mit der Schleimhaut verbundenes lymphoretikulares Gewebe zur Schaffung von Schleimhaut-Immunität;

als kombiniertes Präparat zum Potenzieren der Immunantwort eines Menschen oder eines anderen Tieres.

2. Zubereitung nach Anspruch 1, worin das bioaktive Mittel ein Antigen, ein Allergen, ein Lymphokin, ein Cytokin, ein Monokin oder ein Immuno-Modulator ist.

3. Zubereitung nach Anspruch 2, worin das bioaktive Mittel Influenza-Antigen, Staphylococcus-Antigen, Atemwegs-Syncytien-Antigen (respiratory syncytial antigen), Parainfluenzavirus-Antigen, Hemophilus-Influenza-Antigen, Bordetella pertussis-Antigen,

Neisseria gonorrhoeae-Antigen, Streptococcus pneumoniae-Antigen, Plasmodium falciparum-Antigen, Helminthen-Pathogen-Antigen (helminthic pathogen antigen), Virus-Antigen, Bakterien-Antigen, Pilz-Antigen oder Protozoen-Antigen oder ein Antigen zum Impfen gegen Allergien ist.

4. Zubereitung nach Anspruch 3, worin das bioaktive Mittel einen Influenza-Virus oder Staphylokokken-Enterotoxin B umfaßt.

5. Zubereitung nach einem der Ansprüche 1 bis 4, worin der Träger ein Polymer oder Copolymer umfaßt.

6. Zubereitung nach Anspruch 5, worin der Träger ein Poly-(DL-lactid-co-glycolid), ein Poly-(L-lactid), ein Poly-(DL-lactid), ein Poly-(glycolid), ein Copolyoxalat, ein Polycaprolacton, ein Poly-(lactid-co-caprolacton), ein Polyesteramid, einen Polyorthoester, eine Poly-( $\beta$ -hydroxybuttersäure) oder ein Polyanhydrid oder eine Mischung daraus umfaßt.

7. Zubereitung nach einem der Ansprüche 1 bis 6, worin die Zubereitung angepaßt ist ausschließlich für eine orale Verabreichung an den Gastrointestinaltrakt.

8. Zubereitung nach einem der Ansprüche 1 bis 6, worin die Zubereitung angepaßt ist ausschließlich für eine orale Inhalation, eine nasale Verabreichung, eine rektale Verabreichung oder eine ophthalmische Verabreichung.

9. Zubereitung nach einem der Ansprüche 1 bis 6, welche bestimmt ist zur oralen Inhalation, nasalen Verabreichung, rektalen Verabreichung oder ophthalmischen Verabreichung.

10. Verwendung von

- (1) biokompatiblen Mikrokapseln, die ein bioaktives Mittel umfassen, das in einem biokompatiblen Träger eingekapselt ist, und die eine Größe von  $1\ \mu\text{m}$  bis weniger als  $5\ \mu\text{m}$  aufweisen, zur Schaffung systemischer Immunität; und

(2) biokompatiblen Mikrokapseln, die ein bioaktives Mittel umfassen, das in einem biokompatiblen Träger eingekapselt ist, und die eine Größe zwischen 5  $\mu\text{m}$  und 10  $\mu\text{m}$  aufweisen, zur Schaffung von Schleimhaut-Immunität, bei der Herstellung einer Zubereitung, die selektiv durch das mit der Schleimhaut verbundene lymphoretikuläre Gewebe absorbiert werden kann, zur Schaffung von sowohl systemischer Immunität als auch Schleimhaut-Immunität bei einem Menschen oder einem anderen Tier.

11. Verfahren zur Herstellung einer Zubereitung, um bei einem Menschen oder einem anderen Tier sowohl systemische Immunität als auch Schleimhaut-Immunität zu schaffen, wobei das Verfahren den Schritt umfaßt, daß man für eine derartige Verwendung formuliert

- (1) biokompatible Mikrokapseln, die ein bioaktives Mittel umfassen, das in einem biokompatiblen Träger eingekapselt ist, und die eine Größe von 1  $\mu\text{m}$  bis weniger als 5  $\mu\text{m}$  aufweisen, um systemische Immunität zu schaffen, und
- (2) biokompatible Mikrokapseln, die ein bioaktives Mittel umfassen, das in einem biokompatiblen Träger eingekapselt ist, und die eine Größe zwischen 5  $\mu\text{m}$  und 10  $\mu\text{m}$  aufweisen, um Schleimhaut-Immunität zu schaffen.

12. Verwendung nach Anspruch 10 oder Verfahren nach Anspruch 11, welche(s) außerdem das bzw. die spezielle(n) Merkmal(e) einschließt, das/die in einem oder mehreren der Ansprüche 2 bis 9 genannt ist/sind.

13. Zubereitung, die angepaßt ist ausschließlich zur Verabreichung auf einem Weg, der von einer oralen Verabreichung verschieden ist, an den Gastrointestinaltrakt, zur selektiven Abgabe eines bioaktiven Mittels an mit der Schleimhaut verbundenes lymphoretikuläres Gewebe eines Menschen oder eines anderen Tieres, wobei die Zubereitung umfaßt

- (1) biokompatible Mikrokapseln, die ein bioaktives Mittel umfassen, das in einem biokompatiblen Träger eingekapselt ist, und die eine Größe von 1  $\mu\text{m}$  bis weniger als 5  $\mu\text{m}$  aufweisen, um systemische Immunität zu schaffen, und

- (2) biokompatible Mikrokapseln, die ein bioaktives Mittel umfassen, das in einem biokompatiblen Träger eingekapselt ist, und die eine Größe zwischen  $5\text{ }\mu\text{m}$  und  $10\text{ }\mu\text{m}$  aufweisen, um Schleimhaut-Immunität zu schaffen, mit der Maßgabe, daß entweder (i) die Zubereitung angepaßt ist ausschließlich für eine orale Inhalation, eine nasale Verabreichung, rektale Verabreichung oder ophthalmische Verabreichung, oder (ii) der Träger kein Proteinoid ist.

14. Zubereitung nach Anspruch 13, welche außerdem das bzw. die spezielle(n) Merkmal(e) einschließt, das/die in einem oder mehreren der Ansprüche 2 bis 6, 8 und 9 genannt ist/sind.

15. Verwendung biokompatibler Mikrokapseln, die ein bioaktives Mittel umfassen, das in einem biokompatiblen Träger eingekapselt ist, und die eine Größe von  $1\text{ }\mu\text{m}$  bis weniger als  $5\text{ }\mu\text{m}$  aufweisen, zur Absorption durch und zum Durchgang durch mit der Schleimhaut verbundenes lymphoretikulares Gewebe zur Herstellung einer Zubereitung, um systemische Immunität zu schaffen.

16. Verwendung biokompatibler Mikrokapseln, die ein bioaktives Mittel umfassen, das in einem biokompatiblen Träger eingekapselt ist, und die eine Größe zwischen  $5\text{ }\mu\text{m}$  und  $10\text{ }\mu\text{m}$  aufweisen, zur Absorption und Retention durch mit der Schleimhaut verbundenes lymphoretikulares Gewebe bei der Herstellung einer Zubereitung, um Schleimhaut-Immunität zu schaffen.

17. Verwendung nach Anspruch 15 oder Anspruch 16, welche außerdem das bzw. die spezielle(n) Merkmal(e) einschließt, das/die in einem oder mehreren der Ansprüche 2 bis 9 genannt ist/sind.

18. Zubereitung zur Potenzierung der Immunantwort eines Menschen oder eines anderen Tieres, welche Mikrokapseln umfaßt, die eine Größe zwischen  $1\text{ }\mu\text{m}$  und  $10\text{ }\mu\text{m}$  aufweisen und ein bioaktives Mittel enthalten, das in einem biokompatiblen Träger eingekapselt ist,

wobei die Zubereitung angepaßt ist ausschließlich zur parenteralen Verabreichung, mit der Maßgabe, daß der Träger kein Proteinoid oder keine Polyacryl-Stärke ist.

19. Zubereitung nach Anspruch 18, welche außerdem das bzw. die spezielle(n) Merkmal(e) einschließt, das/die in einem oder mehreren der Ansprüche 2 bis 6 genannt ist/sind.

20. Verfahren zur Herstellung einer pharmazeutischen Zubereitung, umfassend die Schritte, daß man

- ein bioaktives Mittel in einem biokompatiblen Träger unter Bildung erster Mikrokapseln, die eine Größe von 1  $\mu\text{m}$  bis weniger als 5  $\mu\text{m}$  aufweisen, und zweiter Mikrokapseln, die eine Größe zwischen 5  $\mu\text{m}$  und 10  $\mu\text{m}$  aufweisen, einkapselt; und
- die ersten und zweiten Mikrokapseln zu einer pharmazeutischen Zubereitung formuliert, die angepaßt ist ausschließlich für die Verabreichung über einen Weg, der verschieden ist von einer oralen Verabreichung, an den Gastrointestinaltrakt, mit der Maßgabe, daß entweder (i) die Zubereitung angepaßt ist ausschließlich für eine orale Inhalation, eine nasale Verabreichung, rektale Verabreichung oder ophthalmische Verabreichung, oder (ii) der Träger kein Proteinoid ist.

21. Verfahren nach Anspruch 20, welches außerdem das bzw. die spezielle(n) Merkmal(e) einschließt, das/die in einem oder mehreren der Ansprüche 2 bis 6 genannt ist/sind.

22. Verfahren zur Herstellung einer pharmazeutischen Zubereitung, das die Schritte umfaßt, daß man

- ein bioaktives Mittel in einem biokompatiblen Träger unter Bildung von Mikrokapseln mit einer Größe zwischen 1  $\mu\text{m}$  und 10  $\mu\text{m}$  einkapselt; und
- die Kapseln zu einer Zubereitung formuliert, die angepaßt ist ausschließlich zur parenteralen Verabreichung, mit der Maßgabe, daß der Träger kein Proteinoid oder keine Polyacryl-Stärke ist.

23. Verfahren nach Anspruch 22, welches außerdem das bzw. die spezielle(n) Merkmal(e) umfaßt, das/die in einem oder mehreren der Ansprüche 2 bis 6 genannt ist/sind.

24. Zubereitung zur Potenzierung der Immunantwort eines Menschen oder eines anderen Tieres, welche eine Mischung eines ersten freien bioaktiven Mittels zur Schaffung einer primären Antwort und biokompatible Mikrokapseln mit einer Größe zwischen 1  $\mu\text{m}$  und 10  $\mu\text{m}$  umfaßt und ein zweites bioaktives Mittel enthält, das in einem biokompatiblen Träger eingekapselt ist, zur pulsartigen Freigabe unter Schaffung einer Folge-Antwort.

25. Zubereitung nach Anspruch 24, worin wenigstens eines der Mittel ein Antigen, ein Allergen, ein Lymphokin, ein Cytokin, ein Monokin oder ein Immuno-Modulator ist.

26. Zubereitung nach Anspruch 24, worin sowohl das erste als auch das zweite Mittel ein Antigen sind oder worin beide Mittel ein Allergen sind.

27. Zubereitung nach einem der Ansprüche 24 bis 26, worin der Träger eine Substanz ist, wie sie in Anspruch 5 oder in Anspruch 6 definiert ist.

28. Verfahren zur Herstellung einer pharmazeutischen Zubereitung, welches die Schritte umfaßt, daß man

- ein bioaktives Mittel, das gewählt ist aus Antigenen, Allergenen, Lymphokinen, Cytokinen, Monokinen und Immuno-Modulator-Mitteln, in einem biokompatiblen Träger unter Bildung von Mikrokapseln mit einer Größe zwischen 1  $\mu\text{m}$  und 10  $\mu\text{m}$  einkapselt; und
- ein bioaktives Mittel, das unter den vorstehend genannten Mitteln ausgewählt ist, in freier Form und die Mikrokapseln in die Zubereitung formuliert.

29. Verfahren nach Anspruch 28, worin sowohl das erste Mittel als auch das zweite Mittel ein Antigen sind oder worin beide Mittel ein Allergen sind.



30. Verfahren nach Anspruch 28 oder Anspruch 29, worin der Träger wie in Anspruch 5 oder in Anspruch 6 definiert ist.